

DISSERTATION

Einfluss Formulierungsparametern auf die nasale Verfügbarkeit von Natriumcromoglicat, Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Sigrun Krase
geboren am 15.05.1974
in Neustrelitz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. S. Keipert
2. Prof. Dr. H.-H. Borchert
3. Prof. Dr. H. Behrbohm

eingereicht: 26.02.2003
Datum der Promotion: 18.06.2003

ABSTRACT-DEUTSCH

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Formulierungsparametern auf die nasale In-vitro-Verfügbarkeit der Arzneistoffe Oxymetazolinhydrochlorid (OXY), Xylometazolinhydrochlorid (XYLO) und Natriumcromoglicat (DSCG) und untersucht das Permeationsverhalten von ausgewählten Fertigpräparaten und Eigenrezepturen an exzidiierter Rindernasemukosa sowie deren Wechselwirkungen mit einer Mucinmodelldispersion. Der Vergleich der strukturanalogen Sympathomimetika XYLO und OXY gegeneinander und mit dem Antiallergikum DSCG sollte hinsichtlich der Einfluss nehmenden Parameter den Bezug zur molekularen Struktur und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Arzneistoffe ermöglichen. Eine mit DSCG durchgeführte In-vivo-Studie (Kaninchen) sollte klären, inwieweit die In-vitro-Daten und -Einflussparameter mit dem In-vivo-Verhalten korrelieren.

Während im Resümee dieser Arbeit für XYLO und OXY Zusammenhänge zwischen ihren physikochemischen Eigenschaften, ihrer In-vitro-Permeabilität und den getesteten Formulierungsparametern aufgezeigt werden konnten, war dies für DSCG nicht möglich und ein Querbezug nicht gegeben. DSCG zeigt aufgrund seiner nachgewiesenen konzentrationsabhängigen Selbstassoziationstendenz substanzspezifisches Verhalten und reagiert sensibel auf eine Variation der Formulierungsparameter. Sowohl an der isolierten Mukosa als auch mit der Mucinmodelldispersion resultierten ausgeprägte Wechselwirkungen. Eine Kombination von DSCG mit dem Polymer Natriumhyaluronat erwies sich dabei als vorteilhaft, da sich die Mukoadhäsivität in vivo bestätigte. Eine entsprechende Formulierung scheint geeignet die Dosierungshäufigkeit von Natriumcromoglicat zu reduzieren und damit die Patientencompliance zu verbessern.

Da die nasale Verfügbarkeit eines Pharmakons das Resultat eines komplexen Wechselspiels zwischen dem Wirkstoff, den vielfältigen Faktoren der applizierten Arzneiformulierung und den physiologischen Gegebenheiten ist, sind Verallgemeinerungen der Zusammenhänge schwierig und isolierte Effekte kaum zu erfassen. Die vorliegenden Resultate verdeutlichen jedoch, wie eminent wichtig die separate Betrachtung jedes Wirkstoffpräparates ist.

nasal, Permeation, Mukoadhäsion, Hilfsstoffe

ABSTRACT-ENGLISCH

This thesis presents the formulation parameter's influence on the nasal in vitro availability of the model drugs xylometazoline hydrochlorid (XYLO), oxymetazoline hydrochlorid (OXY) and disodium cromoglycate (DSCG). The nasal availability has been studied using excised nasal bovine mucosa to capture the drug's in vitro permeation behaviour and a mucin model dispersion to determine the drug's interactions with the nasal mucus glycoproteins. The aim of this thesis was to determine the influence of different additional on the nasal availability using commercial and test preparations of the model drugs. Comparing the results of the sympathomimetic XYLO, its hydroxy derivative OXY and the mast cell stabilizer DSCG with regard to the exerting formulation parameters should facilitate a relation between the drugs' molecular structure and physical-chemical properties. In the case of DSCG a concluding in vivo study on rabbits should clarify if influences established in vitro result in a altered availability in vivo too.

Whereas for XYLO and its hydroxy derivative OXY connections between their physical-chemical properties, the in vitro permeation behaviour and the investigated formulation parameters exist but not for DSCG is a link between the three drugs not possible. DSCG possesses a strong substance specific component due to its concentration dependent self-association which reacts sensitively to altered formulation parameters. DSCG interacts with the isolated absorptive mucosa as well as with mucin model dispersion in a marked extent. The combination of DSCG with the polymer sodium hyaluronate possesses in vivo an in vitro clear mucoadhesive properties which seem to be suitable to reduce DSCG's application frequency and improve thereby the patients' compliance.

A drug's nasal availability results on a complex interplay of its physical-chemical properties, diverse formulation parameters and physiological conditions. Generalizations between the determined connections are difficult and isolated effects are hardly ascertainable. Additionally to the numerous formulation parameters with an impact on a drug's nasal availability it is necessary to look at every drug formulation separately.

nasal, permeation, mucoadhesion, additives

We are just a moment in time...

(Anathema, 1996)

*Frei nach Neil Armstrong war die vorliegende Arbeit ein großer Schritt für mich und dabei lediglich ein kleiner Beitrag im Lauf der Zeit.
Sie sei denjenigen gewidmet, die mich dabei begleitet, vor dem Fallen bewahrt und mir die Hand gereicht haben. Das waren in erster Linie meine Eltern, meine Familie, Holger, Tom und Heiko Stettin.*

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Keipert für die Überlassung des Themas und für ihre stete Bereitschaft zu kritischen Diskussionen.

Ohne die durch sie eingeräumte Möglichkeit der selbstständigen Er- und Bearbeitung der Thematik, wäre meine wissenschaftliche und persönliche Entwicklung nicht in dieser Weise gefordert, geprägt und vor allem gefördert worden.

Auch der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie sei an dieser Stelle ein Dankeschön gewidmet, insbesondere Herrn Dr. Ingo Siebenbrodt und Frau Ilse Fleischer.

Besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. Stettin von der PHYSIKA Messtechnik GmbH, Stuttgart, für seine stete Hilfsbereitschaft bei rheologischen Fragestellungen danken.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	PROBLEMSTELLUNG	2
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
3.1	Anatomie und Physiologie der Nase	3
3.1.1	Makroskopischer Aufbau	3
3.1.2	Mikroskopischer Aufbau	4
3.1.3	Mukoziliäre Clearance	5
3.2	Allergische Erkrankungen der Nasenschleimhaut	5
3.2.1	Genese	5
3.2.2	Therapie	6
3.3	Nasale Verfügbarkeit von Arzneistoffen	7
3.3.1	Allgemeines	7
3.3.2	In-vitro-Permeation und -Penetration	10
3.3.3	Mucinwechselwirkungen – Mukoadhäsion	13
3.4	Untersuchungen	18
3.4.1	Arzneistoffe	18
3.4.1.1	Natriumcromoglicat (DSCG)	18
3.4.1.2	Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid	20
3.4.2	Verwendete Hilfsstoffe	21
3.4.2.1	Konservierungsmittel/Synergist	21
3.4.2.2	Isotonisierungsmittel	22
3.4.2.3	Natriumhyaluronat	23

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	24
4.1	Entwicklung und Validierung der Analysenverfahren (HPLC)	24
4.1.1	Allgemeines	24
4.1.2	Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid	26
4.1.3	Natriumcromoglicat	28
4.2	Vergleichende Untersuchungen von Natriumcromoglicat, Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid	30
4.2.1	Fertigarzneimittel	31
4.2.1.1	Zusammensetzung und Charakterisierung der Fertigarzneimittel	31
4.2.1.2	In-vitro-Permeation	34
4.2.1.3	Mucinwechselwirkungen	37
4.2.2	Eigenrezepturen	40
4.2.2.1	In-vitro-Permeation	40
	A Permeation aus isotonem Phosphatpuffer	41
	B Einfluss von Benzalkoniumchlorid und EDTA	44
	C Einfluss der Tonizität	46
	D Einfluss des Isotonisierungsmittels	48
	E Resümee der Permeationsstudien	51
4.2.2.2	Mucinwechselwirkungsstudien	52
4.2.2.3	Vitalität und Integrität der Mukosa	54
	A Lactatdehydrogenase- und Proteinbestimmungen	54
	B Leitfähigkeitsmessungen	56
4.3	Spezielle Untersuchungen mit Natriumcromoglicat	60
4.3.1	In-vitro-Permeation	60
4.3.1.1	Einfluss der Natriumcromoglicatkonzentration	60
	A Physikalisch-chemische Untersuchungen	60
	B In-vitro-Permeation	64
4.3.1.2	Vorinkubation der Mukosa mit Natriumcromoglicat	67
4.3.1.3	Einfluss von Polysorbat	71
4.3.1.4	Einfluss des Konservierungsmittels	74
4.3.1.5	Einfluss des Isotonisierungsmittels und Puffers	76
4.3.1.6	Resümee	79
4.3.2	In-vitro-Penetration	80
4.3.2.1	Einfluss von Benzalkoniumchlorid und EDTA	81
4.3.2.2	Einfluss der Konzentration	83

4.3.3 Rheologische Untersuchungen – Mucinwechselwirkungen	85
4.3.3.1 Rheologie – Theoretische Grundlagen	85
A Rheologische Größen	85
B Rheologische Körper	86
C Rotationsrheologie	87
D Oszillationsrheologie	88
E Rheologische Auswertemodelle	89
4.3.3.2 Untersuchungen	91
4.3.3.3 Rheologie – Mucinwechselwirkungen	91
A Rotationsrheologie	91
B Oszillationsrheologie	96
4.3.3.4 Rheologische Untersuchungen der Polymerzubereitungen	103
4.3.3.5 In-vitro-Liberation	105
A Einleitung	105
B Untersuchungen	107
C Ergebnisse und Diskussion	109
4.3.3.6 Resümee der rheologischen Untersuchungen und Mucinwechselwirkungsstudien	113
4.3.4 In-vivo-Studien am Kaninchen	116
4.3.4.1 Einleitung	116
4.3.4.2 Einfluss der applizierten Konzentration von DSCG und von Natriumhyaluronat	117
4.3.4.3 Einfluss der Formulierungsparameter (FAM)	120
4.3.4.4 Charakterisierung der Lösung aus Natriumhyaluronat und DSCG	121
 5 MATERIALIEN UND METHODEN	 123
 5.1 Materialien	 123
5.1.1 Arzneistoffe	123
5.1.2 Fertigarzneimittel	123
5.1.3 Hilfsstoffe	123
5.1.4 Pufferlösungen	124
5.1.5 Chemikalien	124
 5.2 Methoden	 125
5.2.1 Physikalisch-chemische Untersuchungen	125
5.2.1.1 pH-Wert	125
5.2.1.2 Osmolalität	125
5.2.1.3 Oberflächenspannung	125
5.2.1.4 Dichte	126
5.2.1.5 Dynamische Viskosität	126
5.2.1.6 Leitfähigkeitsmessungen	126
5.2.1.7 Verteilungskoeffizient	126
5.2.1.8 Assoziatbildungen, Kritische Mizellbildungskonzentration	127

5.2.2	Gehaltsbestimmungen	128
5.2.2.1	Validierungsparameter	128
5.2.2.2	Qualitätssicherung während der Probenmessungen	130
5.2.2.3	HPLC-Methoden	131
5.2.2.4	Fluorimetrie	132
5.2.2.5	UV/Vis-Spektroskopie	132
5.2.3	In-vitro-Permeationen	133
5.2.4	In-vitro-Penetrationen	134
5.2.5	Rheologische Untersuchungen	134
5.2.5.1	Oszillationsrheologie	135
5.2.5.2	Rotationsrheologie	135
5.2.5.3	In-vitro-Liberation	136
5.2.6	In-vivo-Versuche	137
5.2.7	Proteinbestimmungen	138
5.2.8	Gleichgewichtsdialysen	138
5.2.9	Stabilitätsuntersuchungen	139
5.2.10	Statistik	139
6	ZUSAMMENFASSUNG	140
7	ANHANG	145
7.1	Tabellenverzeichnis	145
7.2	Abbildungsverzeichnis	147
7.3	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Arzneistofflösungen	148
7.4	In-vitro-Permeationsdaten für Nephrophan®	150
7.4.1	Vergleichende Untersuchungen mit den Eigenrezepturen	150
7.4.2	Spezielle Untersuchungen mit DSCG	151
7.5	CMC-Bestimmungen	152
7.6	Statistische Vergleiche der Mucinwechselwirkungsstudien	153
7.7	Statistische Vergleiche der Liberationsstudien	154
8	LITERATUR	155

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS*Abkürzungen im Text*

ANOVA	einfache Varianzanalyse
AR	allergische Rhinitis
AU	Flächeneinheiten (Area units)
AUC	Fläche unter der Kurve (Area under the curve)
BAC	Benzalkoniumchlorid
CBF	Zilienschlagfrequenz (Ciliary beat frequency)
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration
DSCG	Natriumcromoglicat (Disodium cromoglycate)
DV	dynamische Viskosität
EBS	physiologische Pufferlösung pH 7,4 (Earls Balanced Salt Solution)
EDTA	Editinsäure-Dinatriumsalz
FAM	Fertigarzneimittel
FLU	Fluorescein-Natriumsalz
HA	Natriumhyaluronat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
i.v.	intravenöse Applikation
K	Korrelationskoeffizient
LDH	Laktatdehydrogenase
LF	Leitfähigkeit
List	Puffersysteme nach List
m	Steigung
MC	Methylcellulose
MCC	mukoziliäre Clearance
MM	Molekülmasse
M _r	Relative Molmasse
OFS	Oberflächenspannung
QP	Qualitätskontrollproben
OXY	Oxymetazolinhydrochlorid
PBS	isotonische Phosphatpufferlösung pH 6,0 (Phosphate buffer solution)
pH	pH-Wert
PS	Polysorbat 80
RM	Rhinitis medicamentosa
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
SEM	Standardfehler (Standard error of mean)
TEER	Transepithelialer Widerstand (Transendo-/epithelial electrical resistance)
TJ	Tight-junctions
VK	Verteilungskoeffizient
XYLO	Xylometazolinhydrochlorid

Physikalische Größen, Verzeichnis der Symbole

α	Dissoziationskonstante
D_{app}	apparenter Diffusionskoeffizient [cm^2/s]
G'	Speichermodul [Pa]
G''	Verlustmodul [Pa]
$\tan \delta$	Verlustfaktor
P_{app}	apparenter Permeabilitätskoeffizient [cm^2/s]
Q_t	freigesetzte Arzneistoffmenge [μg] bzw. [%] (m/m) zum Zeitpunkt t [min]
$\eta_{D=x}$	apparente Viskosität bei einem Schergefälle von $D = x \text{ 1/s}$ [Pas]
D	Schergefälle [1/s]
τ	Schubspannung [Pa]
ω	Kreisfrequenz [1/s]
t	Zeit [min]
η	dynamische Viskosität [Pas]
c_0	Ausgangskonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
γ	Deformation
$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit [1/s]
F_T	Tangentialkraft [N]
δ	Phasenverschiebung [$^\circ$]
γ_0	Schergeschwindigkeitsamplitude [1/s]
τ_0	Schubspannungsamplitude [Pa]
p	Ostwald-Fließindex
K_{in}	Invasionskonstante [1/min]
K_{el}	Eliminationskonstante [1/min]
$t_{1/2}$	Halbwertszeit [1/min]
$ \eta^* $	Betrag der komplexen Viskosität [Pas]
c_{max}	maximale Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
pK_a	Aziditätskonstante (negativ dekadischer Logarithmus)
c_{SP}	Gehalt in der Spülflüssigkeit in mg je mg Membran
c_T	Gewebegehalt in mg je mg Membran
t_{max}	Zeit der maximalen Konzentration [min]
μ	Ionenstärke
$TEER$	Transepithelialer Widerstand [$\Omega \text{ cm}^2$]
PD	Potentialdifferenz [V]
I_{SC}	Kurzschlussstrom [A/cm^2]
$M-Ix$	Mukoadhäsionsindex [Pa]
M	Drehmoment [Nm]

1 EINLEITUNG

Allergische Erkrankungen stellen ein bedeutendes Gesundheitsproblem dar. Der Therapie der saisonalen und ganzjährigen allergischen Rhinitis kommt aus gesundheitspolitischer Sicht große Bedeutung zu, da ca. 15 % der Bevölkerung von dieser Erkrankung betroffen sind und Folgeerkrankungen, wie das Asthma bronchiale, im Sinne eines Etagenwechsels nachfolgen können [1].

Neben der Allergenkarenz und Hyposensibilisierungstherapie besteht die Möglichkeit der medikamentösen Behandlung der allergischen Rhinitis durch systemische oder lokale Applikation von Antiallergika. Die systemische Verabreichung von Antiallergika wird aufgrund auftretender Nebenwirkungen immer wieder kontrovers diskutiert. Gegenwärtig geben die als ursprünglich nebenwirkungsarm eingeschätzten, neueren Antiallergika, die nichtsedierenden Antihistaminika, Anlass zu Diskussionen. Wie schon für Terfenadin und Astemizol [2] sind nun auch für das häufig eingesetzte Loratidin sowohl kardiovaskuläre [3] als auch lebertoxische [4] Nebenwirkungen nach systemischer Gabe beschrieben worden. Die lokale Therapie erscheint unter diesem Aspekt die günstigere Wahl zu sein.

Doch auch bei den Akuttherapeutika, den alpha-Sympathomimetika, den Glucocorticoiden und den Antihistaminika stellt sich die Frage nach systemischen Nebenwirkungen, denn eine Vielzahl von Wirkstoffen wird über die Nasenschleimhaut rasch und gut resorbiert [5, 6, 7]. So sind zum Beispiel für Propranolol [8] und Progesteron [9] nach nasaler Gabe mit i.v. vergleichbare Wirkstoffspiegel beschrieben worden. Bei Generika taucht zusätzlich das Problem der Einflussnahme von Hilfsstoffparametern auf das nasale Absorptionsgeschehen auf, was im Zuge der Aut-idem-Regel größtenteils wenig Berücksichtigung findet.

Bei den als gut verträglich eingestuften, lokal wirksamen antiallergischen Standardtherapeutika [10, 11], den Mastzellstabilisatoren, erweist sich die Notwendigkeit der häufigen Applikation als Nachteil. Da die allergische Reaktion durch den Antigenkontakt der Mastzellen des Bindegewebes und des Epithels der Nasenschleimhaut ausgelöst wird [1], sind im Zuge des Entstehens des allergischen Ereignisses konstante therapeutische Wirkstoffspiegel der mastzellstabilisierenden Substanzen erforderlich [12]. Ist jedoch dazu die häufige Applikation der Antiallergika vonnöten, muss mangelnde Compliance durch den Patienten befürchtet werden. Da infolge der mukoziliären Clearance (MCC) die nasal applizierten Substanzen zudem nur kurz am Resorptionsort Schleimhaut verweilen [13], ist eine längere Verweildauer, möglichst ohne Beeinträchtigung des wichtigen physiologischen Schutzmechanismus (MCC), wünschenswert. Auch hier können die Hilfsstoffparameter Einfluss nehmen, aber im positiven Sinne durch Einsatz z. B. viskositätserhöhender oder mukoadhäsiver Makromoleküle zu einem neuen, optimierten Formulierungskonzept für nasale Antiallergika führen.

2 PROBLEMSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Formulierungsparametern auf die nasale In-vitro-Verfügbarkeit der Arzneistoffe Oxymetazolinhydrochlorid (OXY), Xylometazolinhydrochlorid (XYLO) und Natriumcromoglicat (DSCG). Die Verfügbarkeitsstudien beinhalteten die Erfassung des In-vitro-Permeationsverhaltens und der Wechselwirkungen mit einer Mucindispersion von ausgewählten Fertigpräparaten (FAM) und **Eigenrezepturen**¹ der Modellarzneistoffe. Im Vordergrund stand dabei die Frage des Einflusses variierender Hilfsstoffzusätze auf die nasale Verfügbarkeit der Arzneistoffe. Der Vergleich der Strukturanaloga XYLO und OXY untereinander und mit DSCG sollte hinsichtlich der Einfluss nehmenden Parameter den Bezug zur molekularen Struktur und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Arzneistoffe ermöglichen.

Im Falle von Natriumcromoglicat sollten weitere Untersuchungen den Einfluss von ausgewählten Formulierungsparametern auf das In-vitro-Permeations- und In-vitro-Penetrationsverhalten in Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanz sowie die Art der Wechselwirkungen mit der Mucindispersion klären. Eine abschließende In-vivo-Studie diene der Überprüfung, ob die in vitro festgestellten Einflüsse auch in einer veränderten Verfügbarkeit in vivo resultieren. Für DSCG wurde darüber hinaus die Empfehlung einer Rezepturoptimierung hinsichtlich maximaler Verfügbarkeit bei minimaler Dosierungshäufigkeit angestrebt.

Folgende Einzelaufgaben ergaben sich für die vorliegende Arbeit:

- Erstellung und Validierung analytischer Methoden für die Gehaltsbestimmung der Arzneistoffe im Rahmen der Permeations-, Penetrations-, Liberations- und In-vivo-Studien
- Charakterisierung ausgewählter Fertigpräparate
- Erfassung der Mucinwechselwirkungen und des In-vitro-Permeationsverhaltens von Fertigpräparaten und Eigenrezepturen aller drei Arzneistoffe
- Physikalisch-chemische Charakterisierung von Natriumcromoglicatlösungen und weitergehende Permeations- und Penetrationsstudien unter Variation ausgewählter Formulierungsparameter und der Arzneistoffkonzentration
- Oszillations- und rotationsrheologische Untersuchungen sowie Liberationsstudien zur Klärung der Mucinwechselwirkungen von Natriumcromoglicat
- Etablierung eines Tierversuchsmodells zum Studium der In-vivo-Verfügbarkeit von Natriumcromoglicat und Entwicklung der Plasmaanalytik

¹ Die im Folgenden als **Eigenrezeptur** bezeichneten, selbst hergestellten Arzneistofflösungen sind den Fertigarzneimitteln der Arzneistoffe hinsichtlich ihrer Hilfsstoffzusammensetzung und deren Konzentration nachempfunden.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1 Anatomie und Physiologie der Nase

Die Nase ist als Teil des Nasopharynx (Hals-Nasen-Rachenraum) Bestandteil der zuleitenden Atemwege. Der Nase kommt nicht nur die Aufgabe der Zu- und Ableitung der Atemluft zu, sondern sie erfüllt auch eine Reihe wichtiger Hilfsfunktionen. Hierzu gehören die Reinigung, Erwärmung und Befeuchtung der eingeatmeten Luft.

Die Reinigungsfunktion der Nase besteht hauptsächlich im Abfangen von kleineren Partikeln, von Staub und Bakterien durch die Nasenschleimhaut, die die zuleitenden Nasenwege überzieht [14]. Der von der Nasenschleimhaut sezernierte Schleim wird durch die Zilien des Respirationsepithels rachenwärts befördert und schließlich verschluckt. Bestimmte mechanische oder chemische Reize lösen reflektorisch das Niesen aus und bewirken damit das Herausschleudern von Fremdkörpern [15]. Erwärmung und Befeuchtung der Atemluft kommen durch die große Oberfläche, die leistungsfähigen Schleimdrüsen und die gute Durchblutung der Nasenschleimhaut zustande. Neben diesen Funktionen als Bestandteil der Atemwege ist die menschliche Nase auch der Sitz des Geruchssinns und ist als Resonanzorgan für Stimme und Sprache anzusehen [14].

Störungen in der Funktion der Nasenatmung und daraus resultierende Mundatmung verhindern die effektive Anfeuchtung, Erwärmung und Filterung der eingeatmeten Luft. Chronisch entzündliche Erkrankungen der Rachenschleimhaut, des Kehlkopfes und der tieferen Atemwege können die Folge sein. Zudem werden die Klangbildung der Stimme und der Geruchssinn beeinträchtigt [14].

3.1.1 Makroskopischer Aufbau

Der Nasenraum setzt sich aus der äußeren Nase und der Nasenhöhle zusammen. Die äußere Nase besteht aus dem knöchernen Gerüst des Nasenbeines und den sich daran lückenlos nach vorn aneinanderreihenden knorpeligen Anteilen, die zusammen Nasenwurzel, Nasenrücken, Nasenspitze und Nasenflügel bilden. Die beiden paarigen Nasenlöcher bilden den Naseneingang. Am Übergang des Naseneinganges zur Nasenhöhle befindet sich der Nasenvorhof (Vestibulum nasi). Dieser trägt lange reusenartige Haare (Vibrissae), die dem Abfangen gröberer Verunreinigungen der Atemluft dienen.

Die knöcherne Nasenhöhle (Cavum nasi) ist ein paarig angelegter Hohlraum, der zwei frontal gestellte innere Öffnungen zum Rachen, die Choanen, besitzt und mit Schleimhaut ausgekleidet ist. Die Nasenhöhle wird durch die Nasenscheidewand (Septum nasi) in zwei Hohlräume unterteilt. Die Nasenmuscheln (Conchae nasales) sind aus der seitlichen

Knochenwand herausragende Knochenspannen, die der Oberflächenvergrößerung dienen und die Nase in je drei Nasengänge gliedern. Mit der Nasenhöhle stehen paarige Hohlräume, die Nasennebenhöhlen, und die Öffnung des Tränennasenganges in Verbindung (Abb. 1) [7, 17].

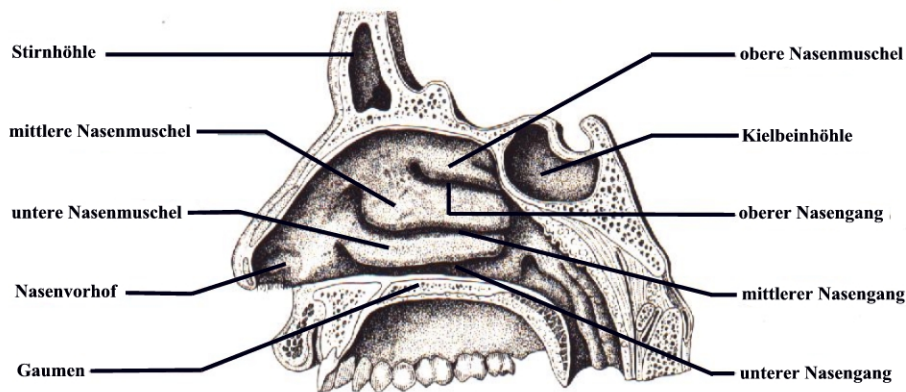


Abbildung 1: Lateralen Schnitt durch die menschliche Nasenhöhle; nach [14]

3.1.2 Mikroskopischer Aufbau

Die Nasenschleimhaut, die die knöcherne Nasenhöhle auskleidet, lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die respiratorische Schleimhaut (Regio respiratoria) und die Riechschleimhaut (Regio olfactoria).

Die eigentliche Nasenhöhle ist größtenteils von der respiratorischen Schleimhaut ausgekleidet. Die Regio respiratoria mit einer Fläche von 120 cm^2 ist ein mehrreihiges Flimmerepithel mit Becherzellen und seromukösen Drüsen im angrenzenden Bindegewebe. Vor allem im Bereich der unteren Nasenmuscheln und des Septums ist ein umfangreiches Venengeflecht ausgebildet. Dieses dient vor allem dem Vorwärmen der Luft und kann durch Hemmen des Blutabflusses ein schnelles Anschwellen der Schleimhaut bewirken.

Die Riechregion liegt auf der oberen Nasenmuschel. Das ca. $2 \times 2,5 \text{ cm}^2$ große Riechepithel wird aus drei Zelltypen gebildet, den Sinneszellen, den Stützzellen und den Basalzellen. Die über das Niveau der Stützzellen hinausragenden, kolbenartigen Auftreibungen der Riechzellen sind mit von Schleim überzogenen Zilien besetzt. Die effektorischen Nervenfortsätze durchziehen die Siebplatte und verlaufen zum vorderen Teil des Riechhirns [14].

3.1.3 Mukoziliäre Clearance

Unter der mukoziliären Clearance (MCC) wird das äußerst effektive Zusammenspiel des von der respiratorischen Nasenschleimhaut sezernierten Schleims und der Bewegung der Zilien des Flimmerepithels verstanden. Dabei spielen Anzahl, Struktur und Aktivität der Zilien sowie ihre koordinierte Bewegung eine ebenso große Rolle wie die Menge und die biochemischen, physikalischen und rheologischen Eigenschaften des Mukus. Die MCC ist ein wichtiger Schutzmechanismus des Respirationstraktes, stellt aber gleichzeitig den begrenzenden Faktor für die Verweildauer nasal applizierter Substanzen dar [16, 17].

3.2 Allergische Erkrankungen der Nasenschleimhaut

3.2.1 Genese

Die allergische Erkrankung der Nasenschleimhaut durch inhalative Allergene, die allergische Rhinitis (AR), ist als Entzündungsreaktion aufzufassen [1].

Die inhalativen Allergene werden grob in saisonale (vor allem Baum-, Gras- und Kräuterpollen), perenniale (insbesondere Hausstaubmilben und Tierhaare) und berufliche Allergene unterteilt. Allergische Reaktionen der Nasenschleimhaut können daneben aber auch auf perkutanem, peroralem oder intrakutanem Weg hervorgerufen werden [1].

Die allergische Rhinitis gehört zur Gruppe der allergischen Sofortreaktionen, der Typ I-Reaktionen. Allergische Reaktionen vom Typ I werden durch IgE-Antikörper vermittelt, die sich hauptsächlich auf der Zellmembran von Mastzellen befinden. Mastzellen sind basophile Granulozyten, die in Blut- und Bindegewebsmastzellen unterschieden werden. Die Mastzellen stellen die Effektorzellen der allergischen Sofortreaktion dar und sind nach ihrer Aktivierung auch an anderen Entzündungsreaktionen beteiligt, da sie neben Histamin auch Entzündungsmediatoren enthalten. Die Bindung von inhalierten IgE-Antigenen auf der Oberfläche der Bindegewebsmastzellen bringt diese zur Ausschüttung von hauptsächlich Histamin, das der bedeutendste Mediator der allergischen Sofortphase ist, an die sich eine Spätphasenreaktion anschließt. Diese ist durch die Ausschüttung von Zytokinen, die Expression von Adhäsionsrezeptoren und die Aktivierung von T-Lymphozyten gekennzeichnet und führt zur Einwanderung von Entzündungszellen, sodass die allergischen Charakteristika einer viralen oder bakteriellen Entzündung ähneln. Die nasale Allergenexposition führt zu einer spezifischen oder unspezifischen Hyperreagibilität der Schleimhaut, die auch auf andere Organe Auswirkungen haben kann [18, 19].

3.2.2 Therapie

Die Erkenntnis über die allergische Entzündungsreaktion hat in den letzten Jahren wesentlich dazu beigetragen, dass ein Wechsel von der symptomatischen zur antientzündlichen Therapie erfolgte [1].

Einen Überblick über die eingesetzten Arzneistoffe und deren Wirkungsmechanismen gibt Tabelle 1 [1, 10, 11, 18, 19].

Tabelle 1: Übersicht über die Arzneistoffe¹ zur Therapie der allergischen Rhinitis

<i>Mastzellstabilisatoren (sl: Natriumcromoglicat; l: Nedrocromil-Natrium)</i>	
<i>Wirkung:</i>	mastzellstabilisierend und antientzündlich
<i>Vorteil:</i>	kaum lokale Nebenwirkungen, keine Gefahr systemischer Neben- oder Wechselwirkungen, prophylaktische Therapie
<i>Nachteil:</i>	mäßige Wirksamkeit, schlechte Patientencompliance durch häufiges Applizieren und die unmittelbar fehlende Linderung der Symptomatik
<i>Applikation:</i>	lokal oder systemisch ²
<i>Antihistaminika (sl: Loratidin, Azelastin; l: Levocabastin; s: Terfenadin u. a.)</i>	
<i>Wirkung:</i>	mastzellstabilisierend und antientzündlich
<i>Vorteil:</i>	kaum lokale Nebenwirkungen, keine Gefahr systemischer Neben- oder Wechselwirkungen, prophylaktische Therapie
<i>Nachteil:</i>	mäßige Wirksamkeit, schlechte Patientencompliance durch häufiges Applizieren und die unmittelbar fehlende Linderung der Symptomatik
<i>Applikation:</i>	lokal oder systemisch ³
<i>Corticosteroide (l: Fluticason, Flunisolid u. a; s: Dexamethason, Prednisolon u. a.)</i>	
<i>Wirkung:</i>	potent antiallergisch und antientzündlich
<i>Vorteil:</i>	hohe Wirksamkeit bei zumeist geringer systemischer Resorption nach lokaler Gabe
<i>Nachteil:</i>	schlechte Patientencompliance durch Corticoidphobie der Bevölkerung, zur problematische Dosierung bei gleichzeitiger Anwendung von Corticoiden Asthmatherapie
<i>Applikation</i>	lokal oder systemisch ⁴
<i>alpha-Sympathomimetika (l: Oxymetazolinhydrochlorid, Xylometazolinhydrochlorid)</i>	
<i>Wirkung:</i>	schleimhautabschwellend
<i>Vorteil:</i>	schnelle Behebung der Symptomatik
<i>Nachteil:</i>	Gefahr systemischer Nebenwirkungen, Entwicklung einer Abhängigkeit und daraus resultierend die Schädigung der Nasenschleimhaut
<i>Applikation:</i>	lokal

¹ Applikation: s: systemisch, l: lokal, sl: systemisch oder lokal

² Die systemische Gabe von Natriumcromoglicat ist lediglich bei durch Nahrungsmittel hervorgerufener AR indiziert.

³ Die systemische Gabe von Natriumcromoglicat ist lediglich bei durch Nahrungsmittel hervorgerufener AR indiziert.

⁴ Nur kurzzeitige systemische Gabe zur Anstoßtherapie bei schwerer Rhinitis.

Für die antientzündliche medikamentöse Therapie stehen die Mastzellstabilisatoren, systemische und topische Antihistaminika sowie topische Glucocorticoide zur Verfügung. Im Akutfall ist die kurzzeitige Anwendung lokaler alpha-Sympathomimetika möglich [1].

Natriumcromoglicat wird in Therapierichtlinien zur Behandlung der allergischen Rhinitis als sicheres und fast nebenwirkungsfreies Antiallergikum beschrieben [10, 11]. Obwohl klinische Tests eine Wirksamkeit der Mastzellstabilisatoren in der Therapie der AR belegen [20], unterliegen sie in Hinblick auf die Effektivität den Antihistaminika und Glucocorticoiden. Da die Therapie mit dem Mastzellstabilisator die prophylaktische Applikation mit 2- bis 4maliger Anwendung erfordert, ist mangelnde Patientencompliance ein ursächlicher Grund [10].

Die Reduzierung der Dosierungshäufigkeit, z. B. durch Viskositätserhöhung der Zubereitung und einer damit längeren Verweildauer auf der Nasenschleimhaut, ist ein mögliches, bisher für diese Substanz noch nicht beschriebenes Optimierungskonzept. Die Kombination mit einem Mukoadhäsivum eröffnet dabei die Möglichkeit der verlängerten Wirkung bei „kontrollierter“ Freigabe [7].

3.3 Nasale Verfügbarkeit von Arzneistoffen

3.3.1 Allgemeines

Die nasale Absorption von Arzneistoffen ist Objekt zahlreicher Forschungen [5]. Das Hauptaugenmerk wurde dabei bisher auf die systemische Verfügbarkeit von Proteinen und Peptiden nach nasaler Applikation gerichtet, die z. B. im Falle endogener Peptidhormone durch gentechnologische Herstellungsmöglichkeiten vermehrt als Therapeutika zur Verfügung stehen [21]. Die nichtinvasive Applikation über die gut durchblutete Nasenschleimhaut bietet

- unter weitgehender Vermeidung der Inaktivierung der Proteine und Peptide im Magen-Darm-Trakt,
- einer Einschränkung des First-pass-Effektes
- sowie einer höheren Bioverfügbarkeit als nach peroraler Gabe

eine Reihe von Vorteilen und somit eine Alternative zur zumeist notwendigen intravenösen Applikation. Als Nachteil der nasalen Verabreichung sind große individuelle Schwankungen und die oft geringe Absorption, verglichen mit der intravenösen Applikation, zu nennen [22].

Obwohl die nasale Mukosa für eine Vielzahl hydrophiler und lipophiler Substanzen gut permeabel ist [23, 24], stellt sie infolge der mukoziliären Clearance [16], der aufgelagerten Mukusschicht [25] und der vergleichsweise hohen Enzymaktivität dennoch eine Barriere dar [22]. Vielfältige Untersuchungen zielen auf die Entwicklung moderner Arzneiformen, die die Verweildauer auf der Nasenschleimhaut erhöhen (z. B. nasale Pulverformulierungen [26], mukoadhäsive Mikrosphären [27, 28] sowie andere mukoadhäsive Arzneiformen [29]) und

die Absorption verbessern (ggf. durch Zusatz absorptionsfördernder [30] und/oder enzymhemmender Substanzen [31]), ohne dabei die wichtigen physiologischen Schutzmechanismen der Nasenschleimhaut zu beeinträchtigen. So ist zum Beispiel die nasale Applikation von Insulin in Form bioadhäsiver Mikrosphären denkbar [32], da aus der Kombination mit dem mukoadhäsiven Polymer Carbopol® Insulinplasmaspiegel resultierten, die denen einer dreimal so hohen Dosis nach s.c. Gabe entsprachen [33]. Auch die aktive Immunisierung scheint über den nasalen Applikationsweg möglich zu sein, da nach einem Antigenkontakt sowohl eine lokale als auch eine systemische Immunreaktion ausgelöst wird [34, 35].

Es ist bekannt, dass die physikochemischen Eigenschaften eines Arzneistoffes und die Formulierungsparameter der Arzneiform Einfluss auf die nasale Verfügbarkeit nehmen [36, 37]. Im Zuge der wachsenden Bedeutung des nasalen Applikationsweges für die systemische Verfügbarkeit von Arzneistoffen und umgekehrt zum Verständnis systemischer Nebenwirkungen bei angestrebter lediglich lokaler Wirksamkeit ist die exakte Kenntnis der Beeinflussung des transmukosalen Transportes elementar. Die Komponenten der Arzneiformulierung können sowohl die Verfügbarkeit als auch die Integrität und Funktionalität der mukosalen Barriere beeinflussen. Sie nehmen somit in mehrfacher Hinsicht Einfluss auf das nasale Absorptionsgeschehen. Abbildung 2 gibt einen Überblick über Einfluss nehmende Parameter.

Eine Vielzahl von Modellen zur Durchführung nasaler Verfügbarkeitsstudien ist in der Literatur beschrieben worden. Neben In-vivo-Modellen [38, 39] und In-situ-Perfusionsmodellen [40] seien an dieser Stelle hauptsächlich die In-vitro-Modelle aufgeführt [13, 41, 42, 43]. Der Vorteil der In-vitro-Permeationstechnik liegt in der weniger aufwendigen Analytik, der schnelleren Durchführbarkeit und infolge reduzierter pre- und postmukosaler Faktoren in einer besseren Standardisierbarkeit [41]. Neben exzidierten tierischen nasalen Geweben von Rind, Schwein, Kaninchen, Affe und Hund, ggf. auch synthetischen Membranen, rücken zunehmend Zellkulturen menschlichen nasalen Gewebes in den Vordergrund [44, 45].

Das In-vitro-Modell wird immer dann Mittel der ersten Wahl sein, wenn lediglich ein Screening verschiedener Einflüsse oder die vergleichende Untersuchung zu einflussnehmenden Parametern durchgeführt werden soll [42]. Der Nachteil der In-vitro-Versuchsanordnung liegt darin, dass der Einfluss der mukoziliären Clearance auf das nasale Absorptionsgeschehen nicht erfasst wird. Die MCC hat auf die Absorptionsprofile nasal applizierter Substanzen jedoch entscheidenden Einfluß. Die Untersuchung des Einflusses der im In-vitro-Permeationsversuch getesteten Formulierung auf die Zilienschlagfrequenz und die rheologischen, biochemischen und physikalischen Eigenschaften des nasalen Mukus stellt daher eine sinnvolle Ergänzung der In-vitro-Permeationstechnik dar. Ein nachfolgender In-vivo-Versuch diene in der vorliegenden Arbeit dazu, die in vitro gewonnenen Daten auf ihre Korrelierbarkeit mit physiologischen Gegebenheiten zu überprüfen.

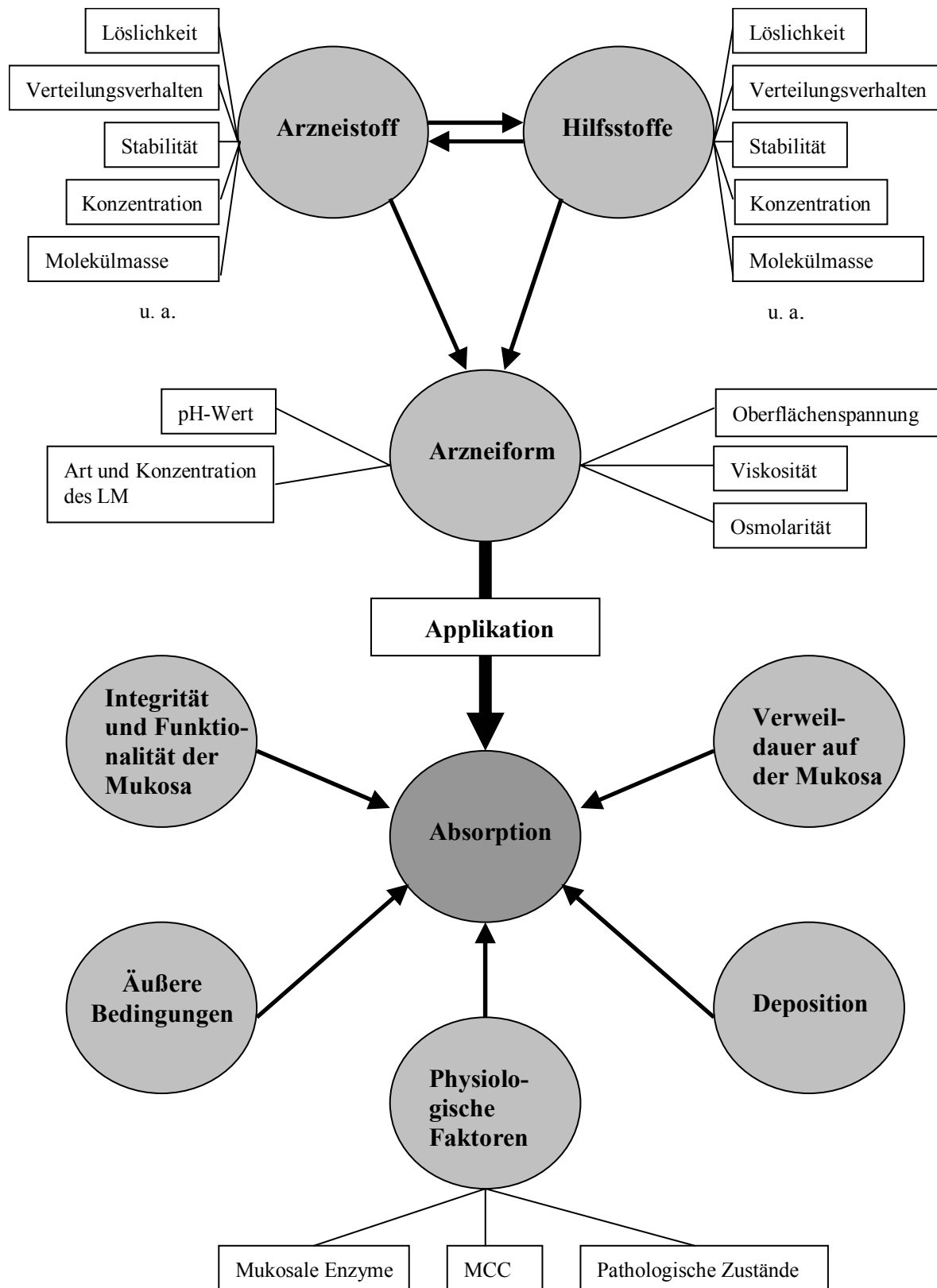


Abbildung 2: Einfluss nehmende Parameter auf die nasale Verfügbarkeit eines Arzneistoffes aus der Arzneiform „Nasentropfen“; erstellt nach [5, 21, 36, 37]

Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen zur In-vitro-Permeationstechnik an exzidiertem tierischem Gewebe (Rindernasemukosa) dargelegt. Darüber hinaus wird das Phänomen „*Mukoadhäsion*“ erläutert, wobei die mukoadhäsiven Wechselwirkungen von Nasalia mit dem nasalen Mukus im Vordergrund stehen.

3.3.2 In-vitro-Permeation und -Penetration

Im In-vitro-Permeationsversuch wird die Durchlässigkeit einer biologischen oder synthetischen Membran unter konkreten Versuchsbedingungen untersucht. Dabei wird die Verteilung eines Arzneistoffes an der semipermeablen Membran zwischen einem Donator- (arzneistoffhaltig) und einem Akzeptorkompartiment (arzneistofffrei) bestimmt. Die In-vitro-Penetration dagegen betrachtet die Aufnahme eines Arzneistoffes in eine Membran.

Da nasal applizierte Formulierungen vorwiegend die mit respiratorischer Schleimhaut ausgekleidete Nasenhöhle erreichen [46], wird für nasale Permeationsstudien mit exzidiertem tierischem Gewebe bevorzugt das Respirationsepithel verwendet. Wadell et al. [41] zeigten anhand verschiedener nasaler Gewebe, dass das tierische Respirationsepithel in seinen morphologischen, histologischen und physiologischen Eigenschaften mit denen der humanen nasalen respiratorischen Schleimhaut vergleichbar ist. Die für die folgenden Permeations- und Penetrationsstudien eingesetzte exzidierte Rindermukosa ist ein gut untersuchtes und charakterisiertes Gewebe [42].

Abbildung 3 zeigt ein humanes Respirationsepithel. Die zilienlosen und zilientragenden Epithelzellen besitzen eine hohe Anzahl von Mikrovilli (siehe Abb. 4), die zusammen mit der guten Gefäßversorgung [22] die Voraussetzung für hohe Absorptionsraten sind. Zilien mit einer Länge von 4 bis 6 μm befinden sich auf etwa 20 % der Epithelzellen. Weiterhin befinden sich im Respirationsepithel die schleimsezernierenden Becherzellen und die tief in das Bindegewebe eingelagerten submukosalen Schleimdrüsen. Benachbarte Zellen sitzen auf der Basalmembran, die das Epithel vom unterliegenden Bindegewebe abtrennt. Neben diesen differenzierten Zellen befinden sich auf der Basalmembran sogenannte Basalzellen, die zu jedem der genannten Zelltypen differenzieren können [16, 22, 47, 48].

Obwohl die Nasenschleimhaut einen Schutz gegenüber äußeren Faktoren darstellt, ist sie für hydrophile und lipophile Arzneistoffe mit Molekülmassen unter 1000 Da relativ gut durchlässig [7, 24]. Als Transportwege stehen dabei in erster Linie der passive transzelluläre und parazelluläre Mechanismus zur Verfügung (Abb. 4).

Der transzelluläre Transportmechanismus, d. h. der Transport durch die Zellmembran und damit durch die Zelle, steht insbesondere lipophilen Substanzen zur Verfügung, während geladene, hydrophile Stoffe vorwiegend parazellulär transportiert werden [22]. Der parazelluläre Transport zwischen den Zellen hindurch erfolgt durch die Tight-junctions (TJ)

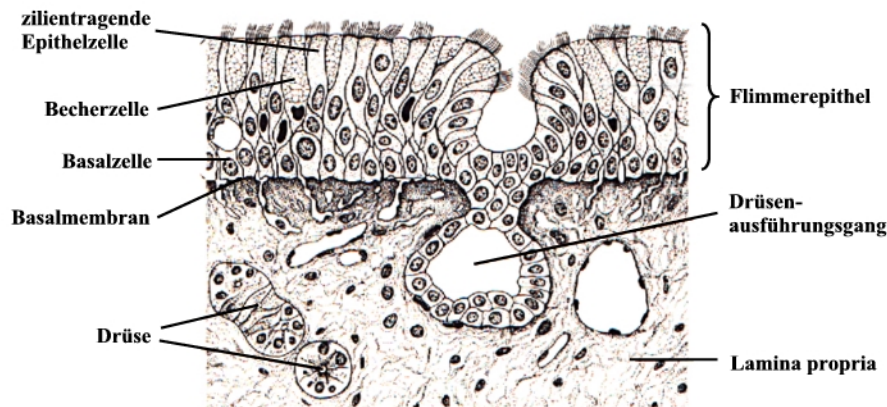


Abbildung 3: Mikroskopischer Schnitt durch das humane Respirationsepithel; nach [15]

oder auch Zonula occludens (ZO), den Verbindungsstellen zwischen benachbarten Epithelzellen (Abb. 4). Im Bereich der sogenannten „Kisses“ ist der Kontakt zwischen benachbarten Zellen so dicht, dass die Zellmembranen zu verschmelzen scheinen [50]. Sie stellen die am stärksten permeabilitätseinschränkende strukturelle Komponente der TJ dar. Aus biochemischer Sicht sind die TJ komplexe Multiproteinstrukturen, die mit den Aktinfilamenten des perijunctionalen Aktin-Myosin-Rings (Abb. 4) der epithelialen Zellen in direkter Verbindung stehen. Zwischen dem Zytoskeletton der epithelialen Zellen und ihren okkludierenden TJ besteht also eine funktionelle Assoziation [49]. Die Regulation des Öffnungszustandes der TJ erfolgt über die Kontraktion des Aktin-Myosin-Rings. Die Kontraktion wird über die Phosphorylierung der TJ-Proteine gesteuert [51]. Calciumabhängige Proteinkinasen und Phosphatasen sind die an diesen Vorgängen beteiligten Enzyme. Auch intrazelluläre Prozesse sind an der Regulation der TJ beteiligt [52].

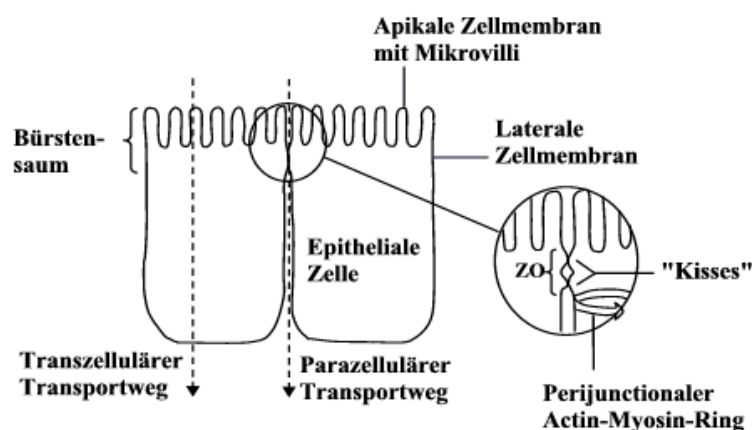


Abbildung 4: Transportmechanismen durch die nasale Mukosa; modifiziert nach [50]
ZO = Zonula occludens (siehe Text)

Die „Porengröße“ der nasalen Membran beträgt ungefähr 3,9 bis 8,4 Å. Die Verbindungen zwischen den Becherzellen bzw. Becherzellen und zilentragenden Zellen sind relativ locker

[22, 53, 54]. Der Verteilungs- und Öffnungszustand der Tight-junctions variiert selbst im intakten biologischen Gewebe stark [51, 55]. Die TJ stellen dynamische Strukturen dar, die ihre Permeabilität entsprechend den physiologischen und pathophysiologischen Gegebenheiten ändern.

Entzündliche Prozesse der Nasenschleimhaut behindern die Steuerung der Permeabilität des parazellulären Transportweges und vermindern dadurch die physikalische Barrierefunktion des Respirationsepithels [22, 54].

Bei Transportstudien an biologischen Membranen ist es wichtig, die Integrität und Vitalität des verwendeten Gewebes zu sichern [41]. Eine Vielzahl von Möglichkeiten steht dabei zur Verfügung. Genannt seien hier:

- Erfassung elektrophysiologischer Parameter (siehe unten)
- biochemische Untersuchungen (Bestimmung von Enzymaktivitäten, z. B. von membrangebundenen Enzymen (5'-Nukleotidase) und zytosolischen Enzymen (Lactatdehydrogenase (LDH)) im Akzeptor- und Donatormedium [56, 57])
- Transport von Markersubstanzen ($[^{14}\text{C}]$ -Mannitol, FITC-Dextran [52, 57])
- histologische Untersuchungen [52, 57]
- Freisetzung bestimmter Markersubstanzen (Protein-, Cholesterolrelease [56]).

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell „exzidierte Rindernasenschleimhaut“ ist die Vitalität unter den jeweiligen Versuchsbedingungen vielfach nachgewiesen worden [41, 42]. In der verwendeten Apparatur erwies sich das Gewebe nach einer Equilibrierungsphase von 20 bis 30 Minuten über eine Versuchsdauer von zwei bis zu acht Stunden als vital [41, 42]. Studien an Kaninchen- und Schweinemukosa bestätigten diese Aussage [13, 58, 59, 60, 61, 62, 63]. Die Vitalität des nichtpräparierten Gewebes wurde mit bis zu 24 Stunden angegeben [59].

Abbildung 5 zeigt eine Side-Bi-SideTM-Apparatur mit dem nötigen Equipment, um die elektrophysiologischen Parameter eines isolierten biologischen Gewebes, die Potentialdifferenz (PD) und den Kurzschlussstrom (I_{SC}), zu erfassen. Erforderlich ist dazu ein 4-Elektrodensystem. Ein Paar Silber/Silberchlorid-Elektroden wird zur Erfassung der sich aufbauenden Potentialdifferenz (Spannung) infolge aktiver Ionentransportmechanismen benötigt, das andere, um den Kurzschlussstrom zu messen, der fließt, um die entstandene Potentialdifferenz auszugleichen. Aus beiden Daten kann dann der transepitheliale Widerstand ($TEER$) nach dem Ohmschen Gesetz berechnet werden.

Die elektrophysiologischen Parameter der Rindermukosa wurden von Schmidt et al. [42] mit $TEER$: $(42 \pm 12) \Omega \text{ cm}^2$, PD : 0,9 bis 2,9 mV und I_{SC} : 36 bis 66 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ angegeben. Im Vergleich dazu wurden für menschliche Mukosa folgende Werte ermittelt: $TEER$: ca. $100 \Omega \text{ cm}^2$, PD : ca. 6 mV und I_{SC} : ca. 58 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ [64]. Bechgaard et al. [65] weisen darauf hin, dass ein Abfall des elektrophysiologischen Parameters $TEER$ in vitro nicht immer

zwangsläufig mangelnde Verträglichkeit in vivo bedeuten muss, da bei der In-vitro-Anordnung die Verdünnung durch das nasale Sekret und Selbstregenerierungsmechanismen durch die Mukosa nicht erfasst werden.

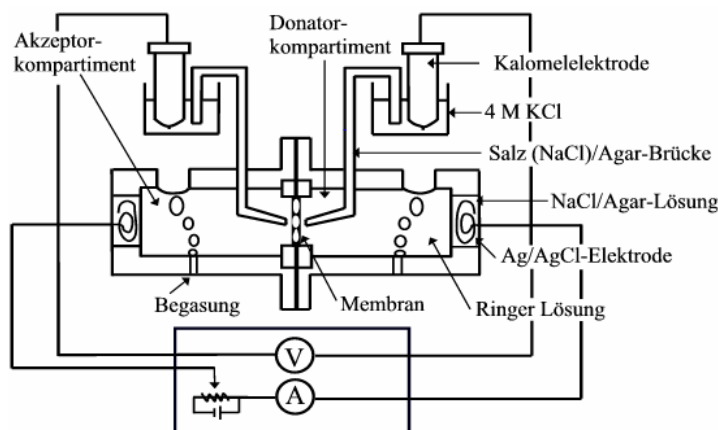


Abbildung 5: Side-Bi-Side™-Apparatur; nach [66]

Der geringe Widerstand dieser biologischen Membran ist ein Indiz für die schwache strukturelle Barrierefunktion der nasalen Mukosa und damit für ihre relativ hohe parazelluläre Permeabilität [22]. Die nasale Mukosa stellt ein „leaky“ Epithel dar [22, 67].

3.3.3 Mucinwechselwirkungen – Mukoadhäsion

Die mukoziliäre Clearance stellt eine effektive Barriere für die Permeation nasal applizierter Arzneistoffe dar. Ursache dafür ist die kurze Verweildauer auf der Nasenschleimhaut, die lediglich 20 bis 30 Minuten beträgt [13, 39]. Der rachenwärts gerichtete Transport kommt durch das effektive Zusammenspiel von Zilienbewegung und Mukus zustande. Neben der Integrität des Ziliarapparates spielen Viskosität und Elastizität des nasalen Mukus in Hinblick auf eine optimale mukoziliäre Clearance eine entscheidende Rolle [16, 68].

Der nasale Mukus ist aus zwei Schichten aufgebaut. Die untere Schicht, die Solphase oder periziliäre Schicht, dient der Rückbewegung der Zilien und schützt das Epithel vor dem Austrocknen. Die obere, viskosere Gelphase dient dem Transport und dem Fixieren inhalierter Partikel [69]. Die Zilien schlagen mit einer Frequenz von 10 bis 20 Hz in einer synchronisierten, metasynchronen Bewegung, aus der eine rachenwärts gerichtete Wellenbewegung resultiert. Für den effektiven Schlag berühren die Zilien die obere, viskose Schicht. Die Rückbewegung erfolgt in der unteren Schicht. Letztlich resultiert eine Scherrate von 1 bis 3 Hz (12 1/s) [16, 68]. Abbildung 6 veranschaulicht diese Bewegungen.

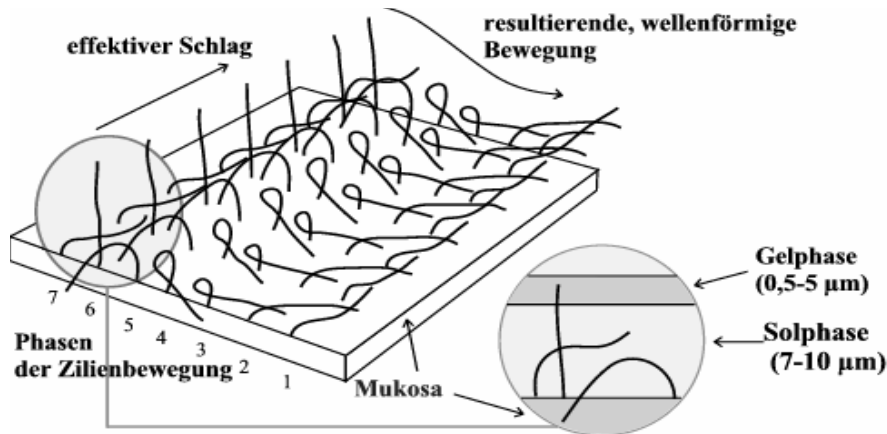


Abbildung 6: Zilientätigkeit und Mukusschicht; modifiziert nach [22]

Der Mukus besteht hauptsächlich aus Wasser, Elektrolyten, verschiedenen Enzymen, Proteinen, Immunglobulinen (vor allem IgA) und zu 5 % aus einer Glykoproteinkomponente (Mucin¹). Er wird von den Becherzellen und seromukösen Drüsen des Bindegewebes synthetisiert. Die Glykoproteinkomponente bestimmt die viskoelastischen, adhäsiven und kohäsiven Eigenschaften des nasalen Mukus [68].

Die Glykoproteine bestehen aus einem Proteingrundgerüst und kovalent gebundenen Oligosaccharidseitenketten (Abb. 7). Die Molekülmasse eines Glykoproteins beträgt ca. 200 kDa. Die negative Ladung kommt hauptsächlich durch die endständige Sialinsäure ($pK_a = 2,8$) der Seitenketten zustande [70].

Der Mukus stellt ein schwaches, dreidimensionales, flexibles Netzwerk aus linearen, gewundenen, hydratisierten Mucinmolekülen dar, das durch quervernetzende Disulfidbrücken, physikalische Verwicklungen und sekundäre chemische, ionische Bindungen zwischen den einzelnen Molekülen oder innerhalb eines Moleküls entsteht [68, 70, 71]. Die isotone Mukusschicht besitzt eine Pufferfunktion und erhält an der Epithelschicht ein leicht saures Mikromilieu mit einem pH-Wert von etwa 6,0 aufrecht [70].

Durch

- die Vielzahl von OH-Gruppen und Oligosaccharidseitenketten,
- die Vielzahl negativ geladener Gruppen,
- den stark hydratisierten Zustand und
- das Netzwerk aus linearen, flexiblen und zufallsvernetzten Glykoproteinmolekülen

ist der Mukus in der Lage, unspezifische Sekundärbindungen einzugehen [70].

¹ Im Folgenden wird der Begriff **Mucin**, der streng genommen nur die Glykoproteinkomponente des Mukus bezeichnet, für die aus dem kommerziell erwerblichen Mukus hergestellte Modelldispersion verwendet. Der „rohe“ Mukus wird durch Abkratzen der Schleimhaut, grobe Reinigung und nachfolgende Gefriertrocknung gewonnen. Er enthält neben den Mucinmolekülen auch alle anderen Bestandteile des Mukus.

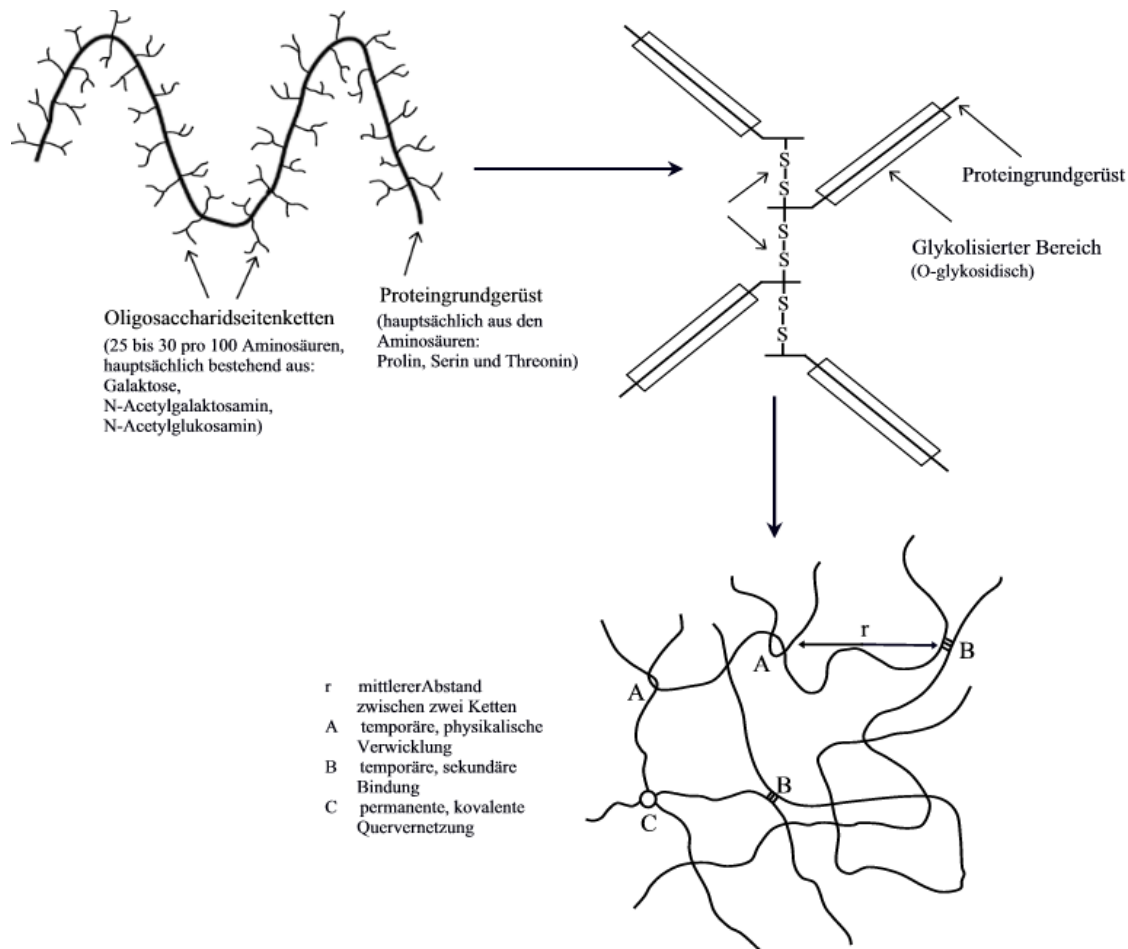


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur der Mukusglykoproteine; modifiziert nach [71]

Unter **Bioadhäsion** versteht man allgemein die Wechselwirkung zwischen verschiedenartigen Makromolekülen einander sich eng berührender Körper, d. h. an der Grenzfläche zweier Phasen, wobei der eine Körper eine biologische Matrix darstellt. Handelt es sich bei dem biologischen Material um eine mit Mukus bedeckte Schleimhaut, spricht man von **Mukoadhäsion** [77]. Damit trifft der Terminus „**mukoadhäsiv**“ streng genommen nur für Polymere zu.

Das Ziel mukoadhäsiver Arzneiformen ist eine Verlängerung der Arzneistoffwirkung durch einen verlängerten, intensivierten Kontakt mit dem Absorptionsort Mukosa [72]. Voraussetzung für eine Mukoadhäsion und damit eine längere Verweildauer auf der Nasenschleimhaut und/oder eines engeren Kontaktes mit der Nasenschleimhaut ist eine Penetration in die Mukusschicht und eine Adhäsion an die nasale Membran [73]. Häufig wird durch mukoadhäsive Arzneiformen auch eine verzögerte, kontrollierte Wirkstofffreigabe angestrebt (Bioadhäsive Freigabesysteme) [68, 74]. Eine gezielte Adhäsion spezifischer mukoadhäsiver Moleküle an bestimmte Gewebe ist denkbar [75, 76].

Bioadhäsive Kräfte können physikalische und/oder mechanische Kräfte sowie primäre oder sekundäre chemische Bindungskräfte sein. Sekundäre chemische Bindungen, d. h.

- Van der Waals-Kräfte (Debye-Kräfte (elektrostatische Bindungskräfte zwischen permanenten Dipolen), London-Dispersionskräfte (elektrostatische Bindungskräfte zwischen induzierten Dipolen)),
- Wasserstoffbrückenbindungen und
- hydrophobe „Bindungen“ (Wechselwirkungen zwischen apolaren Strukturen)

sowie elektrostatische Kräfte (Coulombsche Kräfte) zwischen entgegengesetzt geladenen Teilchen und die Interpenetration mit nachfolgender Verknäulung der Polymerketten sind attraktive Kräfte für die Entwicklung einer mukoadhäsiven Bindung [70, 75, 77, 78]. Aus den möglichen Bindungskräften ergeben sich für potentielle Mukoadhäsiva folgende notwendigen Grundeigenschaften [70]:

- Hydrophile funktionelle Gruppen mit der Fähigkeit zu bioadhäsiven Bindungen
- Möglichst hohe Molekülmasse
- Molekulare Beweglichkeit, d. h. Flexibilität des Polymergerüsts und Mobilität der funktionellen Gruppen für eine gute Interpenetration und Verknäulung

In einer Reihe theoretischer Ansätze wird versucht, das Phänomen Bioadhäsion sowie wirkende Einflussparameter zu definieren. Von besonderer Bedeutung für das Zustandekommen einer mukoadhäsiven Bindung sind dabei in der ersten Phase des Entstehens Oberflächenphänomene, insbesondere die Spreitung [77, 79], und elektrostatische Wechselwirkungen. Nachdem ein enger Kontakt zwischen den Grenzflächen der Reaktanden erfolgt ist, kann eine bioadhäsive Bindung durch die bereits genannten sekundären Bindungskräfte und/oder durch Interpenetration [77, 80, 81] von Polymerketten entstehen bzw. manifestiert werden. Zumeist ist eine Bioadhäsion Resultat aus einer Vielzahl physikochemischer Interaktionen [74, 75]. Da beinahe alle Polymere die Fähigkeit besitzen, in Pulverform auf einer feuchten Schleimhaut zu haften, wird das längere Verweilen von nichthydratisierten Polymeren, nur durch Quellung bedingt, im Allgemeinen nicht als Mukoadhäsion bezeichnet [72].

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Erfassung bioadhäsiver Eigenschaften und des Einflusses auf die Zilientätigkeit von Arznei- und/oder Hilfsstoffen sowie deren Zubereitungen beschrieben worden. Neben der Ermittlung der direkten mukoziliären Transportzeit radioaktiv markierter oder gefärbter Partikel in vivo [16, 46], ist die In-vitro-Technik gut geeignet, um die an der Bioadhäsion beteiligten Mechanismen zu charakterisieren [82]. Duchêne et al. [71], Peppas et al. [77] und Ahuja et al. [83] geben darüber umfassende Überblicke. Mukoadhäsive Fähigkeiten werden hauptsächlich im Zusammenhang mit polymerhaltigen Formulierungen überprüft. Dabei wird in vitro häufig die Haftkraft eines Polymerfilms oder einer Polymerlösung auf biologischem (Schleimhaut, Mukus) oder synthetischem Material ermittelt [84, 85, 86, 87]. Diese Untersuchungen basieren auf der

Tatsache, dass eine mukoadhäsive Bindung in erster Linie an der Grenzfläche Mukus/Polymer entsteht.

Eine Möglichkeit zur direkten Erfassung von „adhäsiven“ Wechselwirkungen nichtpolymerer Arzneistofflösungen mit dem Mukus stellen **rotations-** und **oszillationsrheologische** Untersuchungen dar. Während bei rotationsrheologischen Methoden der Messkörper in der mukushaltigen Messprobe rotiert, wird in der Oszillationsrheologie ein harmonisch schwingender Messkörper benutzt. Oszillationsrheologische Untersuchungen können dabei sowohl die Stärke als auch die Art der Wechselwirkungen mit den Glykoproteinkomponenten des Mukus erfassen.

Die Scherviskosität einer Mucinmodelldispersion ist das Resultat aller physikochemischen Wechselwirkungen (Verwicklungen der Molekülketten, sekundäre Bindungskräfte usw.). Eine mukoadhäsive Bindung, d. h. z. B. zusätzliche Verwicklungen oder sekundäre Bindungen, äußert sich in der Regel in einer überproportionalen Viskositätszunahme [73, 82, 88]. Ausdruck findet diese in einem positiven **Mukoadhäsionsindex** ($M-I_x$). Damit ist gemeint, dass bei der rotationsrheologischen Bestimmung der Viskosität eines Mucin/Formulierungs-Gemisches diese höher ist als die additive Viskosität der beiden Einzelkomponenten. Der Anstieg der Viskosität, relativiert gegen die vorgegebene Scher-belastung (\uparrow 5.2.5.2), wird als Maß für mukoadhäsive Bindungskräfte (Mukoadhäsionsindex) und als Indiz für eine Mucinwechselwirkung betrachtet [88, 89, 90].

Während die Rotationsrheologie nur die Erfassung der Viskosität, d. h. der viskosen Anteile der Mucindispersion ermöglicht, können mittels oszillationsrheologischen Untersuchungen sowohl die viskosen (**Verlustmodul** (G'')) als auch die elastischen (**Speichermodul** (G')) Anteile der Messprobe bestimmt werden. Die Erfassung der Veränderung der oszillationsrheologischen Kenngrößen Verlustmodul, Speichermodul und **Komplexe Viskosität** ($|\eta^*|$) über den Frequenzbereich des schwingenden Messkörpers (**Frequenzsweep**) gibt zudem Einblick in die molekulare Struktur der Messprobe.

Veränderungen im rheologischen Verhalten, insbesondere der Viskoelastizität, reduzieren den mukoziliären Transport [68]. Dabei führen sowohl Unterschreitung als auch Überschreitung eines optimalen Bereiches der rheologischen Kenngrößen zur Abnahme mukoziliärer Transportprozesse. Für verschiedene Polymere bestätigte sich die in vitro festgestellte Mukoadhäsivität (Erhöhung von Viskosität und Viskoelastizität einer Mucinmodelldispersion nach Zusatz der Polymerlösungen) auch in vivo, denn nach nasaler Applikation dieser Polymerlösungen war die mukoziliären Transportleistung deutlich vermindert [91, 92, 94]. Ree et al. [93] fanden für rekonstituierten nasalen Mukus die gleichen viskoelastischen Eigenschaften wie für humanen Mukus.

3.4 Untersuchungen

3.4.1 Arzneistoffe

3.4.1.1 Natriumcromoglicat (DSCG)

Ph. Eur. 2002: *Dinatrium-5,5'-[(2-hydroxypropan-1,3-diyl)bis(oxy)]bis(4-oxo-4H-1-benzopyran-2-carboxylat)*

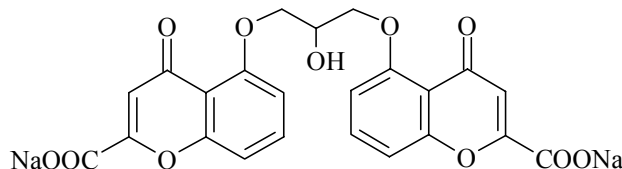
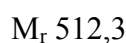


Abbildung 8: Natriumcromoglicat

Die in Wasser leicht lösliche Substanz ist ein weißes kristallines Pulver, das in Abhängigkeit von der Luftfeuchte reversibel pro Mol bis zu 9 Mol Wasser aufnehmen kann. Natriumcromoglicat ist zur Bildung lyotroper Mesophasen befähigt [95, 96]. Die in Wasser unlösliche Dicarbonsäure besitzt einen pK_a -Wert von 2,3. Natriumcromoglicat unterliegt in alkalischen Lösungen einer raschen Hydrolyse. In konzentrierten wässrigen Lösungen liegen die beiden Chromonringe in einem Winkel von 53° zueinander vor. In verdünnten wässrigen Lösungen dagegen zeigen die beiden Ringe Coplanarität [95, 96]. Die UV-Maxima von DSCG in wässriger Lösung sind mit $\lambda = 238 \text{ nm}$ ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ca. 600) und $\lambda = 326 \text{ nm}$ ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ca. 160) angegeben [96]. DSCG wird in der Literatur als Stoff mit eigenartigen chemischen und physikalischen Eigenschaften beschrieben [97].

Der Mastzellstabilisator Natriumcromoglicat wurde bereits 1965 durch die Fisons corporation synthetisiert. 1973 erhielt die Substanz die Zulassung für die Behandlung des Asthma bronchiale [97]. Seit Anfang der achtziger Jahre ist DSCG in Form intranasaler Lösungen zur Therapie der ganzjährigen und saisonalen allergischen Rhinitis verfügbar [98].

Strukturell leitet sich Natriumcromoglicat von Khellin, dem Inhaltsstoff der Pflanze Ammi visnaga ab, die schon von den Ägyptern als Heilpflanze eingesetzt wurde [97].

Der Wirkungsmechanismus für die Substanz ist komplex und bis ins letzte Detail nicht bekannt [98]. Natriumcromoglicat wirkt in der frühen allergischen Phase durch seine mastzellstabilisierenden Eigenschaften. Diskutiert werden für diesen Effekt folgende Mechanismen:

- Reduzierung des Ca^{2+} -Transports durch die Mastzellmembran und dadurch Behinderung der calciumabhängigen Degranulation
- Wechselwirkung mit einem oberflächenständigen Rezeptor auf der Mastzellmembran, verbunden mit einer Inhibition der Proteinkinase C in Gegenwart von Calcium
- Förderung der Akkumulation zyklischer Adenosinmonophosphate,

gefolgt von der Phosphorylierung eines terminalen Proteins und damit der Unterbrechung der allergischen Reaktionskette [99, 100, 101].

Zudem weist die Substanz eine antientzündliche Wirkkomponente auf, da sie den Effekt der Entzündungsmediatoren, vor allem von Neutrophilen und Eosinophilen, in der allergischen Spätphase unterdrückt [10, 11, 97, 98]. DSCG besitzt einen positiven Langzeiteffekt auf die bronchiale Hyperreagibilität beim Asthma bronchiale [97] und wird daher hauptsächlich zur Behandlung des Asthma bronchiale eingesetzt. Die mastzellstabilisierenden Eigenschaften werden jedoch auch zur Behandlung von allergischer Rhinitis und Konjunktivitis erfolgreich genutzt [10, 102].

Die klinische Wirksamkeit bei AR ergibt sich aus der prophylaktischen Anwendung, vor allem bei IgE-verbundener allergischer Rhinitis [11, 102]. Die übliche Dosierung zur Therapie der allergischen Rhinitis beträgt bis zu vier Sprühstöße (20 mg/ml) täglich.

Die Substanz wird nach peroraler Gabe am Menschen kaum resorbiert und unverändert, hauptsächlich über die Fäzes, ausgeschieden. Nach Inhalation hingegen können über das Bronchialepithel bis zu 10 % des DSCG resorbiert werden und in die Blutbahn gelangen. Die Elimination erfolgt durch Ausscheidung des unveränderten DSCG über den Urin sowie die Galle [103]. Es treten infolge der geringen systemischen Verfügbarkeit und der spezifischen Eigenschaften von Natriumcromoglicat kaum systemische Nebenwirkungen auf [10, 11]. DSCG ist aufgrund seiner Hydrophilie und Ladung nicht in der Lage, die Lipiddoppelschicht biologischer Zellmembranen zu überwinden [98, 103]. Die systemische Verfügbarkeit von DSCG resultiert ausschließlich aus parazellulären Transportmechanismen.

Über die Resorption von DSCG am Menschen nach nasaler Gabe liegen keine Angaben vor. Die höhere Permeabilität der nasalen Mukosa, verglichen mit intestinalem Gewebe lässt jedoch eine bessere Resorption von DSCG nach nasaler Applikation vermuten. Die folgenden In-vitro-Permeationsstudien an exzidiert Rindermukosa und In-vivo-Versuche am Kaninchen sollen die nasale Verfügbarkeit von DSCG erfassen und darauf Einfluss nehmende Parameter charakterisieren.

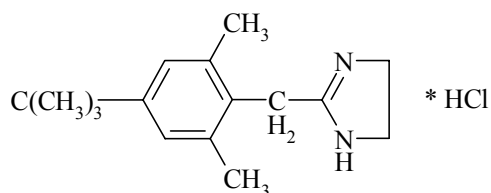
3.4.1.2 Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid

Ph. Eur. 2002:

2-[4-(1,1-Dimethylethyl)-2,6-dimethylbenzyl]-4,5-dihydro-1H-imidazolhydrochlorid

$C_{16}H_{25}ClN_2$

M_r 280,8



Ph. Eur. 2002:

3-[(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl) methyl]-6-(1,1-dimethylethyl)-2-4-dimethylphenolhydrochlorid

$C_{16}H_{25}ClN_2O$

M_r 296,8

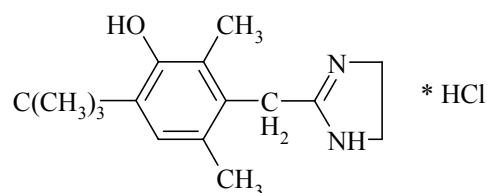


Abbildung 9: Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid

Die beiden α -Sympathomimetika sind mittelstarke Basen, die wie alle Imidazole in alkalischer Lösung der Hydrolyse unterliegen. Das substituierte Imidazolin stellt ein cyclisches Amidin und somit ein Carbonsäure-Derivat dar, das unter dem Einfluss von Hydroxid-Ionen hydrolysierbar ist. Als Produkte der hydrolytischen Spaltung entstehen Ethylendiamin und die entsprechende substituierte Carbonsäure. In ihren wässrigen Lösungen mit einem pH-Wert um 6,0 sind die beiden Arzneistoffe stabil.

Oxymetazolinhydrochlorid ist ein weißes kristallines Pulver, das in mindestens zwei verschiedenen Kristallstrukturen kristallisieren kann. Die Umwandlung der stark hygroskopischen Modifikation in eine stabile, nichthygroskopische ist durch Erhitzen möglich. Daneben ist ein stabiles Monohydrat der Substanz bekannt. Oxymetazolinhydrochlorid und Xylometazolinhydrochlorid sind in Wasser leicht löslich. In unpolaren Lösungsmitteln sind beide Substanzen praktisch unlöslich [104, 105, 106].

Die beiden Arzneistoffe sind Sympathomimetika mit α_2 -agonistischen Wirkungen, die nur lokal appliziert therapeutische Verwendung finden. Nach Applikation auf der nasalen Schleimhaut kommt es innerhalb weniger Minuten zu einem vasokonstriktorischem Effekt, der auf der Aktivierung postsynaptischer α_2 -Rezeptoren beruht. Die Vasokonstriktion führt zu einem Anschwellen der Nasenschleimhaut. Dieser Effekt hält bis zu sechs Stunden an. Die

Substanzen werden infolge der schnell einsetzenden Vasokonstriktion im Allgemeinen über die Nasenschleimhaut in im Blut nichtnachweisbaren und systemisch nichtrelevanten Mengen resorbiert. Jedoch können die Substanzen bei unsachgemäßer Anwendung durch Verschlucken über den Magen-Darm-Kanal resorbiert werden und infolgedessen systemische Reaktionen auslösen. Diese betreffen in erster Linie das Herz-Kreislauf-System. Vorsicht ist insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern geboten, da schwere resorptive Vergiftungserscheinungen auftreten können [104, 106].

Die Anwendungsdauer ist auf drei bis fünf Tage beschränkt, da bei längerer Anwendung mit einer Schleimhautatrophie, der Rhinitis medicamentosa (RM) [107], zu rechnen ist und die Substanzen ziliotoxische Eigenschaften zeigen [16, 108]. Insbesondere die Kombination mit dem Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid wird dabei kritisch bewertet [107] und als wichtiger Faktor bei der Entwicklung einer RM angesehen [109, 110].

Während die übliche Dosierung bei Xylometazolinhydrochlorid 0,1 % (m/V) beträgt, wird Oxymetazolinhydrochlorid in Dosen von 0,05 % (m/V) angewendet.

3.4.2 Verwendete Hilfsstoffe

3.4.2.1 Konservierungsmittel/Synergist

In den nachgestellten Rhinitika-Rezepturen wurde Benzalkoniumchlorid (BAC) (Abb. 10) als Konservierungsmittel und Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Abb. 11) als Synergist (Enhancer) eingesetzt.

Benzalkoniumchlorid (Abb. 10) ist eine in Wasser schwer lösliche, quartäre Ammoniumverbindung, die oberflächenaktive Eigenschaften aufweist. Die Hauptwirkung der Substanz besteht in einer reversiblen Wachstumshemmung von vor allem grampositiven Kokken [111]. Zur Erweiterung des Wirkungsspektrums wird die Substanz häufig mit EDTA (verbesserte Penetration) kombiniert und zur Konservierung nasaler und okularer Zubereitungen eingesetzt [112].

Ph. Eur. 2002: Benzalkoniumchlorid ist ein Gemisch von Alkylbenzyltrimethylammoniumchloriden, deren Alkylteil aus C₈- bis C₁₈-Ketten besteht

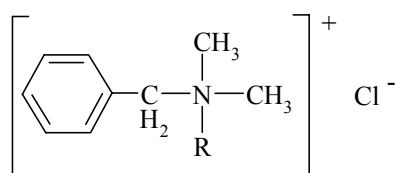


Abbildung 10: Benzalkoniumchlorid

EDTA (Abb. 11) oder vielmehr Na₂-EDTA ist das Natriumsalz der Editinsäure und hat die Eigenschaft, mit Erdalkalien und anderen zweiwertigen Metallionen wasserlösliche, nichtionisierte Komplexe zu bilden [113]. Durch diese chelatbildenden Eigenschaften (vor allem Komplexe mit Calciumionen) wird EDTA häufig als Stabilisator in Kombination mit einem Konservierungsmittel [112] eingesetzt und fungiert gleichzeitig als Enhancer [36].

Ph. Eur. 2002: *Dinatrium-dihydrogen-(ethylen-dinitrilo)tetraacetat-Dihydrat*

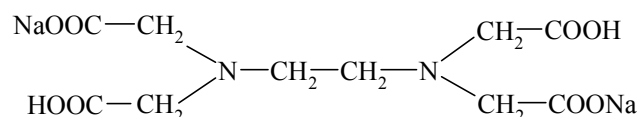
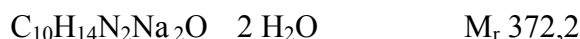


Abbildung 11: Natriumedetat

3.4.2.2 Isotonisierungsmittel

Isotonisierungsmittel werden Zubereitungen zur nasalen Anwendung zugesetzt, um eine Angleichung der osmotischen Druckverhältnisse an physiologische Bedingungen zu erreichen. Nichtisotonisierte Lösungen, hypotonische Lösungen führen nach nasaler Applikation durch das osmotische Gefälle zu einem vorübergehenden Flüssigkeitseinstrom in die Zilienzellen und sind damit physiologisch nicht gut verträglich [56]. Nasal applizierte hypertone Lösungen reizen die Nasenschleimhaut ebenso, da sie zu einem osmotisch induzierten Schrumpfen der Zilienzellen führen.

Die Angleichung der Tonizität an physiologische Verhältnisse kann mit Hilfe von Puffersystemen (in der Regel Phosphatpuffersysteme) und/oder Isotonisierungsmitteln, wie Natriumchlorid, Sorbitol und Glukose, erfolgen. Im Allgemeinen ist eine Isotonisierung mit letzteren anzustreben, da Puffersysteme infolge ihrer Pufferkapazität nicht reizlos vertragen werden.

3.4.2.3 Natriumhyaluronat

Makromoleküle wie Natriumhyaluronat in wässrigen Nasentropfen dienen in der Regel der Viskositätserhöhung, verbunden mit längerer Verweildauer der Formulierung auf der Schleimhaut und besserer Akzeptanz durch den Patienten.

Ph. Eur. 2002: Natriumhyaluronat ist das Natriumsalz der Hyaluronsäure, einem Glucosaminoglycan, bestehend aus Disaccharid-Einheiten aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin

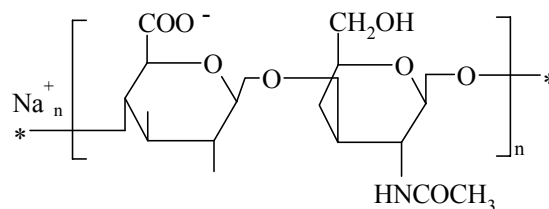


Abbildung 12: Disaccharidbaustein des Natriumhyaluronat

Natriumhyaluronat ist das Natriumsalz der Hyaluronsäure, einem natürlichen Glucosaminoglycan aus alternierenden (1,3)-verknüpften N-Acetyl-β-D-glucosamin- und (1,4)-verknüpften β-D-Glucuronsäureeinheiten mit sehr hoher Molekülmasse.

Natriumhyaluronat ist unter anderem Bestandteil der interzellulären Matrix des menschlichen Gelenkknorpels und bewirkt dort als viskoelastische Gelenkflüssigkeit den Druckausgleich bei Belastung. Aus dieser Eigenschaft ergibt sich das hauptsächliche Einsatzgebiet des Natriumhyaluronats bei degenerativen Gelenkerkrankungen. Daneben findet die Substanz zur lokalen Behandlung schlecht heilender Wunden und in der Augenchirurgie Einsatz [114].

In jüngerer Zeit ist die biotechnologische Herstellung von Hyaluronsäure, die bisher bevorzugt aus Hahnenkämmen gewonnen wurde, möglich [115], sodass ihre mukoadhäsiven Eigenschaften vielfältig genutzt werden können. Als physiologisches, nichttoxisches Makromolekül gelangt sie in der Ophthalmologie als Tränenflüssigkeitsersatz zur Anwendung [116] und ist als potentiell Mukoadhäsivum in nasalen Zubereitungen Objekt vielfältiger Forschung [27, 117].

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Entwicklung und Validierung der Analysenverfahren (HPLC)

4.1.1 Allgemeines

Vergleichende quantitative Aussagen, z. B. über die Verteilung eines Arzneistoffes zwischen zwei flüssigen Kompartimenten, die durch eine biologische oder synthetische Membran getrennt sind, erfordern die exakte Bestimmung des Arzneistoffgehaltes. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob aufgetretene Unterschiede im Verteilungsverhalten systembedingt sind, d. h. in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Kompartimente usw. auftreten, müssen analysebedingte Einflüsse (durch Matrix und analytische Methode) ausgeschlossen werden. Dazu bedarf es der Verwendung etablierter, validierter Analysenmethoden, d. h. der Verwendung von analytischen Methoden, die gleich bleibend zuverlässig richtige Ergebnisse für die Bestimmung des Analyten in der jeweiligen Matrix liefern [118]. Der Validierungsprozess umfasst die Entwicklung der Methode, die Validierung vor den Probenmessungen und die Qualitätssicherung während der Probenmessungen [119]. Die im Zuge der Validierung zu untersuchenden Eigenschaften und deren Umfang ergeben sich aus dem Anwendungsbereich der analytischen Methode [120].

Im Rahmen pharmakokinetischer Untersuchungen, wie sie unter 4.3.4 durchgeführt wurden, kommt der Validierung der bioanalytischen Analysenmethode eine besonders große Bedeutung zu, da der Matrixeinfluss meist sehr komplex ist [121].

Zur Bestimmung der Analyten OXY, XYLO und DSCG in der jeweiligen Matrix wurden Methoden der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Absorptionsdetektion angewendet, die im Falle der bioanalytischen Methode für DSCG (↑ 5.2.2.3 und 5.2.6) mit einer Flüssig-flüssig-Extraktion gekoppelt war. Bei der HPLC kommt es durch Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase zur Auftrennung der in der Probe enthaltenen Komponenten. Die entstehenden Chromatogramme sind qualitativ und quantitativ auswertbar [122]. Als stationäre Phase wurde das in der HPLC am häufigsten angewandte Säulenfüllmaterial, die durch Anknüpfung von C-18-Alkylketten an Silica-Gel gewonnenen Umkehr-Phasen (reversed phase), verwendet [118].

Die Validierung der entwickelten Analysenmethoden und die Qualitätssicherung während der Probenmessungen wurden entsprechend den aktuellen internationalen Anforderungen [120, 121] durchgeführt. Eine detaillierte Aufstellung dieser Richtlinien und Empfehlungen sowie der durchgeführten Untersuchungen im Einzelnen übersteigt jedoch den inhaltlichen Rahmen dieser Arbeit. Im Folgenden werden daher nur die wichtigsten, zur Validierung der analytischen Methoden herangezogenen Eigenschaften erläutert.

Die **Spezifität** ist die Fähigkeit der Methode, den Analyten ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen. Die Überprüfung der Spezifität erfolgt z. B. bei chromatographischen Verfahren durch den Vergleich des Chromatogramms eines Standards mit dem einer Probe, die alle denkbaren Störsubstanzen inklusive der Matrix enthält. Als Schnellmethoden zur Überprüfung auf Überlagerung relevanter Peaks im Chromatogramm sei die Bestimmung von Peakbreite und Asymmetriefaktor im Verhältnis zur Retentionszeit genannt [119].

Die **Richtigkeit** ist das Maß für die Abweichung zwischen dem mittels der betreffenden Methode ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert und damit für den systematischen Fehler der Methode. Als quantitatives Maß für die Richtigkeit gilt die systematische Ergebnisabweichung [119]. Die Bestimmung der Richtigkeit kann unter anderem durch Vergleich der ermittelten Messwerte mit denen einer Methode mit nachgewiesener Richtigkeit (z. B. Gehaltsbestimmung nach einer Pharmakopöe) [120], durch Verwendung von Referenzsubstanzen oder bei nachgewiesener Spezifität und Linearität der Methode durch Plausibilitätserklärung [119] erfolgen.

Neben der Abweichung des Analysenergebnisses vom wahren Wert (Lageparameter) kommt der Bestimmung der **Präzision** als Maß für die Streuung von Analysenergebnissen (Streuparameter) infolge von zufälligen Fehlern große Bedeutung zu. Es wird zwischen der Wiederholpräzision (Schwankung der Analysenergebnisse derselben Probe unter gleichen Bedingungen innerhalb einer Serie oder verschiedener Serien) und der Vergleichspräzision (Schwankung der Analysenergebnisse derselben Probe unter verschiedenen Bedingungen) unterschieden, die sich aus der methodischen und der gerätebedingten Streuung der Messwerte ergibt [119].

Dient eine Methode ausschließlich der quantitativen Bestimmung eines Analyten, ist lediglich die **Bestimmungsgrenze**, d. h. die Konzentration von Interesse, bis zu der der Analyt mit genügender Präzision und Richtigkeit bestimmbar ist [119]. Bei chromatographischen Verfahren, als Verfahren mit einem Grundrauschen des Detektors, kann dazu das Signal-Rausch-Verhältnis dienen. Neben dieser Möglichkeit kann die Bestimmungsgrenze auch anhand der Standardabweichung des Signals und der Steigung der Kalibriergeraden berechnet werden [120].

Die **Kalibrierfunktion** beschreibt den Zusammenhang zwischen dem gemessenen Signal und der Konzentration. Der Arbeitsbereich ist der Konzentrationsbereich der Kalibrierfunktion für den, bei einem linearen Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration, die Methode mit ausreichender Präzision, Richtigkeit und gegebener Linearität dem beabsichtigten Zweck genügt. Genügende Präzision und Richtigkeit heißt z. B. $< 1 \%$ für die Messpräzision, $1-2 \%$ für die Methodenpräzision. Bei komplexer Matrix liegen die Grenzen höher [119].

Die **Robustheit** ist ein Parameter, der eigentlich in der Phase der Methodenentwicklung überprüft und erfasst wird. Eine robuste Methode zeichnet sich durch hohe Reproduzierbarkeit bei Veränderung der analytischen Bedingungen aus. Unterschieden wird zwischen der Methodenrobustheit (Einfluss von Temperatur, pH-Änderung der mobilen Phase, Proben- und Matrixkonzentration), der Verfahrensstabilität (Stabilität der Lösungen) und der Anwendbarkeit (Wechsel von Anwender, Labor oder Gerät) [120].

Für die im Folgenden aufgeführten entwickelten HPLC-Methoden konnten ausreichende Präzision und Richtigkeit bei gegebener Linearität über den Arbeitsbereich der Kalibrierfunktion ermittelt werden [119]. Die Verfahrensstabilität über den Zeitraum der Probenmessungen war gegeben. Die Richtigkeit der Qualitätskontrollproben, die Systemeignung (chromatographische Bedingungen) und die Charakteristika der Kalibriergeraden im Rahmen der Routineanalytik lagen innerhalb der in der Validierung ermittelten 95 % Vertrauensintervalle; Trends waren dabei nicht zu erkennen.

4.1.2 Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid

Ziel war bei diesen beiden Substanzen, die Entwicklung einer HPLC-Methode zu sichern, die eine einfache und zeitsparende Analyse im Rahmen der Permeations- und Liberationsstudien erlaubte. Während die Gehaltsbestimmung in wässrigen Lösungen von XYLO und OXY mittels der UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 217 bis 220 nm ohne weiteres möglich war, zeigten die Akzeptoren (die Matrix) bei den Permeationsstudien hohe, nichtreproduzierbare Eigenabsorptionen bei diesen Wellenlängen. Auf eine Darstellung dieser Untersuchungen und der Parameter der UV-metrischen Methode (↑ 5.2.2.5) wird verzichtet.

Die zum Zeitpunkt der durchgeführten Permeationsstudien in der verfügbaren Literatur beschriebenen Methoden (z. B. [123, 124, 125]) erwiesen sich für die gegebenen Bedingungen und Anforderungen als unpraktikabel oder nicht übertragbar.

Im Rahmen der Entwicklung der HPLC-Methode wurden Wasser/Methanol- oder Wasser/Acetonitril-Gemische verschiedener Zusammensetzung mit und ohne Ionenpaarreagenz¹ (Pentansulfonsäure) bei verschiedenen pH-Werten und Fließgeschwindigkeiten getestet. Triethylamin wurde der wässrigen Phase in verschiedenen Prozentsätzen zugesetzt. Die chromatographischen Bedingungen (↑ 5.2.2.3), die für die Validierung ausgewählt wurden, erzielten hinsichtlich Retentionszeit und Tailingfaktor akzeptable Ergebnisse [126, 127].

¹ Die Trennung ionischer Verbindungen ist in der Reversed-phase-Chromatographie schwierig, da diese mit den noch nichtsilanisierten, hochpolaren OH-Gruppen des Säulenmaterials wechselwirken. Um dem abzuweichen, wird der mobilen Phase ein organisches Salz, ein **Ionenpaarreagenz**, zugesetzt. Die geladenen ionischen Probensubstanzen bilden mit den organischen Ionen des Ionenpaarreagenzes ein Ionenpaar, welches sich ähnlich wie eine Neutralsubstanz auf einer Umkehrphase verzögern lässt.

Der Vergleich der Chromatogramme der Standards von OXY und XYLO mit denen der substanzfreien und substanzhaltigen Matrix zeigte, dass keine störenden Interferenzen durch die Matrix auftraten (Daten nicht dargestellt). Die Steigungen und Achsenabschnitte der Kalibriergeraden der matrixhaltigen und matrixfreien Systeme unterschieden sich nicht signifikant voneinander (*t*-Test). Daher wurden für die Kalibrierung und die Qualitätskontrollproben in diesem Fall matrixfreie Standards verwendet (↑ 5.2.2.2).

Abbildung 13 gibt die typischen Chromatogramme von OXY und XYLO wieder. In Tabelle 2 sind die Hauptvalidierungsparameter aufgeführt.

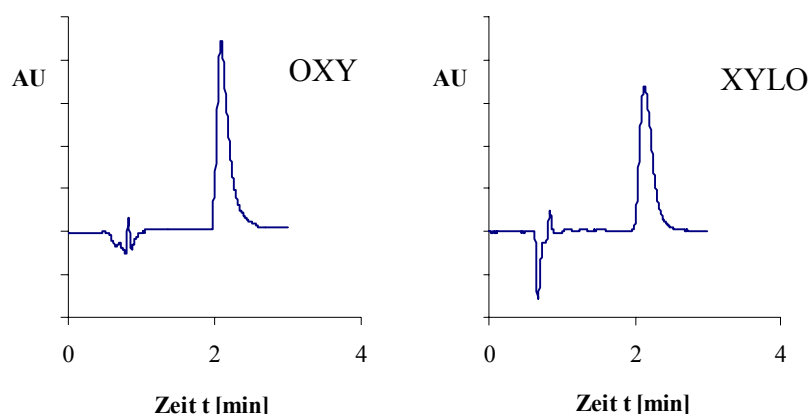


Abbildung 13: Chromatogramme von OXY und XYLO

Tabelle 2: Validierungsparameter der entwickelten HPLC-Methoden für XYLO und OXY¹

	XYLO	OXY
Präzision ^{2,3} [%]	1,38	1,50
Richtigkeit ³ [%]	1,99	2,10
Kalibrierfunktion		
Arbeitsbereich	2 ... 15 µg/ml	2 ... 15 µg/ml
Steigung [µg/ml]	$(5,95 \pm 0,044) \times 10^{-5}$	$(6,44 \pm 0,074) \times 10^{-5}$
Achsenabschnitt [µg]	$0,01 \pm 0,0033$	$0,03 \pm 0,0019$
Korrelationskoeffizient	0,998	0,997
Bestimmungsgrenze [µg/ml]	0,08	0,114
Retentionszeit [min]	$2,15 \pm 0,15$	$2,17 \pm 0,11$
Tailingfaktor	1,34	1,42

¹ Zur Durchführung der Validierung sowie Umfang und Sicherung der Qualität der analytischen Methode während der Probenmessungen siehe Experimenteller Teil (↑ 5.2.2.1 und 5.2.2.2).

² interday

³ 2, 8,15 µg/ml Arzneistoff

4.1.3 Natriumcromoglicat

Bei Natriumcromoglicat stand die Entwicklung einer HPLC-Methode im Vordergrund, die geeignet war, bei Bedarf eine schnelle Routineanalytik zu erlauben und gleichzeitig die Gehaltsbestimmung im Rahmen der In-vivo-Versuche und Penetrationsstudien zu realisieren.

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren erwiesen sich als wenig geeignet für eine Routineanalytik [128, 129, 130], was vor allem damit zu begründen war, dass bei einem pH-Wert der mobilen Phase von 2,3 eluiert wurde und DSCG bei diesem pH-Wert zum Teil noch als ionische Substanz vorlag, die vermutlich mit den freien Silanolgruppen der Säulenmatrix reagierte. Die zitierten Methoden erwiesen sich zudem als wenig geeignet hinsichtlich Methodenrobustheit und Verfahrensstabilität.

Deswegen erfolgte die Umstellung auf eine Elution mit Ionenpaarreagenz¹. Zugleich wurde die Methode so gestaltet, dass bei Bedarf durch Variation der Fließmittelzusammensetzung der mobilen Phase eine Verschiebung zu späteren Retentionszeiten ohne Einbuße der Qualität möglich war. Im Zuge der Entwicklung der Methode wurden verschiedene pH-Werte bei variierender Zusammensetzung des Acetonitril/Puffer- und Acetonitril/Wasser-Gemisches getestet.

Die chromatographischen Bedingungen (↑ 5.2.2.3), die für die Validierung ausgewählt wurden, erzielten hinsichtlich Retentionszeit und Tailingfaktor akzeptable Ergebnisse [126, 127].

Im Rahmen der bioanalytischen Methode wurde kein interner Standard mitextrahiert. Für die Herstellung der Qualitätskontrollproben wurde Schweineplasma verwendet, da die Art des Plasmas keinen Einfluss auf die Kalibrierfunktion ausübte (↑ 5.2.6).

Abbildung 14 zeigt das Chromatogramm von DSCG im Rahmen der „Routineanalytik“ und der Plasmaanalytik (↑ 5.2.2.3 und 5.2.6). Tabelle 3 stellt die während der Validierung ermittelten Charakteristika für die entwickelte Methode dar.

Die entwickelte Methode erwies sich hinsichtlich der Variation der Fließmittelzusammensetzung als ein sehr robustes Verfahren. Auch der Wechsel des Gerätes hatte auf die Messergebnisse keinen Einfluss (Differenzentest, Daten nicht dargestellt).

¹ Als Ionenpaarreagenz kam Tetrabutylammoniumbromid zum Einsatz, das der mobilen Phase zugesetzt wurde.

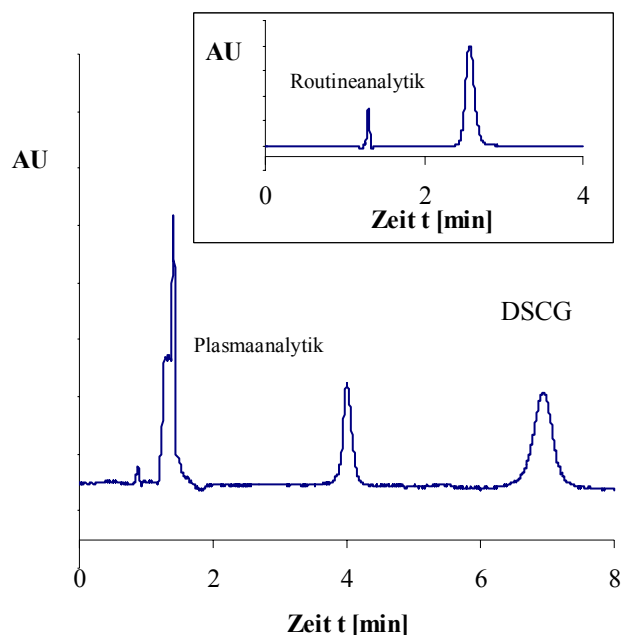


Abbildung 14: Chromatogramme DSCG: Plasmaanalytik und Routineanalytik

Tabelle 3: Validierungsparameter der entwickelten HPLC-Methoden für DSCG¹

	<i>Routineanalytik</i>		<i>Plasmaanalytik</i>
	<i>Fließmittelzusammensetzung der mobilen Phase</i> <i>(Puffer:Acetonitril)</i>		
	<i>75:25</i>	<i>80:20</i>	<i>80:20</i>
Präzision ^{2,3} [%]	2,60	1,53	5,12
Richtigkeit ³ [%]	1,44	1,30	14,40
Kalibrierfunktion			
Arbeitsbereich	0,5 ... 10 µg/ml	0,5 ... 10 µg/ml	0,1 ... 3,0 µg/ml
Steigung [µg/ml]	$(3,76 \pm 0,040) \times 10^{-5}$	$(3,74 \pm 0,058) \times 10^{-5}$	$(3,25 \pm 0,21) \times 10^{-5}$
Achsenabschnitt [µg]	$(-0,014 \pm 0,006)$	$(-0,005 \pm 0,002)$	$(-0,003 \pm 0,002)$
Korrelationskoeffizient	0,999	0,998	0,992
Bestimmungsgrenze [µg/ml]	0,100	0,154	0,115
Wiederfindung [%]	n.b.	n.b.	85,6
Retentionszeit [min]	$(2,59 \pm 0,09)$	$(7,05 \pm 0,05)$	$(7,08 \pm 0,09)$
Tailingfaktor	1,12	1,10	1,12

n.b. nicht bestimmt

¹ Zur Durchführung der Validierung sowie Umfang und Sicherung der Qualität der analytischen Methode während der Probenmessungen siehe Experimenteller Teil (↑ 5.2.2.1 und 5.2.2.2).² interday³ 0,5, 5, 10 µg/ml Arzneistoff (Routineanalytik); 0,5, 1,5, 3 µg/ml Arzneistoff (Plasmaanalytik)

4.2 Vergleichende Untersuchungen von Natriumcromoglicat, Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid

XYLO und OXY wurden für die vergleichenden Untersuchungen als Strukturanaloga mit unterschiedlicher Lipophilie bei annähernd gleicher Molekülgröße gewählt (Tab. 4 und 5). Natriumcromoglicat ist ein hydrophiler Modellarzneistoff mit einer relativ hohen Molekülmasse (Tab. 4 und 5). Tabelle 4 zeigt die Wirkstoffparameter der drei Arzneistoffe in isotonem Phosphatpuffer pH 6,0 (PBS).

Die wässrigen Lösungen der drei Arzneistoffe (0,0039 M) zeigten sich hinsichtlich pH-Wert, Gefrierpunktserniedrigung, dynamischer Oberflächenspannung und Dichte kaum von Wasser verschieden. Auch bei der Verwendung des isotonischen Phosphatpuffers als Lösungsmittel bewirkte der Zusatz der Arzneistoffe keine wesentliche Veränderung der bereits genannten physikalisch-chemischen Eigenschaften (Daten in 7.3 dokumentiert).

Tabelle 4: Wirkstoffparameter von DSCG, XYLO, OXY in PBS pH 6,0

		VK	pK _a	α
DSCG	(M _r 512)	0,128 ± 0,008	2,3	>99 %
XYLO	(M _r 281)	0,440 ± 0,038	10,6	>99 %
OXY	(M _r 297)	0,198 ± 0,070	9,87	>99 %

pK_a Aziditätskonstante
VK Verteilungskoeffizient
α Dissoziationsgrad

Der Phosphatpuffer selbst zeigt jedoch mit seiner Ionenstärke μ einen deutlichen Effekt auf die Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe. So ist z. B. der VK von DSCG in PBS 6,0 (μ 0,201) um das Vierfache größer als in dem des Phosphatpuffersystems nach List [131] (μ 0,088) (siehe Tab. 5).

Tabelle 5: Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe in verschiedenen Puffern

	Phosphatpuffersystem nach List [131] (0,067 M)			PBS (0,162 M)
	pH 5,5	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0
DSCG	0,042 ± 0,006	0,038 ± 0,005	0,052 ± 0,004	0,128 ± 0,008
XYLO	0,335 ± 0,073	0,815 ± 0,159	1,267 ± 0,159	0,440 ± 0,038
OXY	0,168 ± 0,035	0,211 ± 0,159	0,471 ± 0,038	0,198 ± 0,07

4.2.1 Fertigarzneimittel

4.2.1.1 Zusammensetzung und Charakterisierung der Fertigarzneimittel

Die Fertigarzneimittel (FAM), die die drei Arzneistoffe zur nasalen Anwendung enthalten, wurden unter der Vorgabe ausgewählt, dass ein möglichst großes Spektrum variierender Zusammensetzung erfasst wird (Tab. 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung der Fertigarzneimittel¹

Präparat	EDTA	BAC	weitere Hilfsstoffe der wässrigen Lösungen laut Hersteller
<i>Natriumcromoglicat (20 mg/ml)</i>			
Cromo pur von ct [®]	x		Glukose
Cromohexal [®]	x	x	Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriummonohydrogenphosphat, Sorbitol
Cromohexal sanft [®]	x		Sorbitol
Cromo ratiopharm [®]	x		
Vividrin [®]	x	x	Polysorbat 80, Sorbitol, Natriumhydroxid
<i>Xylometazolinhydrochlorid (1 mg/ml)</i>			
Nasan [®]	x	x	Natriumchlorid, Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Polyvidon
Xylo comod [®]	x		Natriumdihydrogenphosphat, Natriummonohydrogenphosphat, Sorbitol
Nasentropfen E ratiopharm [®]		x	
Xylo von ct [®]		x	Glycerol, Zitronensäure, Natriumcitrat
<i>Oxymetazolinhydrochlorid (0,5 mg/ml)</i>			
Nasivin [®]	x	x	Natriumdihydrogenphosphat, Natriummonohydrogenphosphat, Natriumhydroxid

¹ Exakte Angaben hinsichtlich der Konzentration sind lediglich für BAC (0,01 % (m/V)) und EDTA (0,1 % (m/V)) bekannt, nicht aber für isotonisierende und andere Zusätze.

Die Europäische Pharmakopöe (2002) fordert in der Monographie Nasalia, dass bei der Herstellung, Verpackung, Lagerung und dem Inverkehrbringen von Zubereitungen zur nasalen Anwendung Maßnahmen zur Gewährleistung ihrer mikrobiologischen Qualität zu ergreifen sind. Dazu enthalten wässrige Nasentropfen laut Arzneibuch im Mehrdosenbehältnis ein geeignetes Konservierungsmittel. Die als Standardkonservierungsmittel für Nasalia eingesetzte Verbindung Benzalkoniumchlorid ist wiederholt wegen ihrer zilientoxischen Eigenschaften bei Langzeitanwendungen kritisiert worden (↓ 3.4.2.1) [16, 46].

Als zunehmend eingesetzte, moderne Applikationssysteme, die einer Konservierung der enthaltenen Arzneistofflösung nicht bedürfen, seien die COMOD[®]-Systeme genannt [132]. Hierbei handelt es sich um ein doppelwandiges Mehrdosenbehältnis mit flexiblem Innenbeutel, ausgerüstet mit einem Pumpdosiersystem (Airless-Pumpe), bei dem keine kontaminierte Luft oder Flüssigkeit in das Arzneimittel zurückströmen kann, was zusätzlich durch den oligodynamischen Effekt der versilberten Ventileile unterstützt wird.

Die Erkenntnisse über die negativen Eigenschaften von BAC führten z. B. dazu, dass die Nasentropfen E ratiopharm[®] jetzt als konservierungsmittelfreies Präparat im Handel sind. XYLO und OXY enthaltende Fertigarzneimittel werden zunehmend mit Dexpanthenol als pflegender Komponente vertrieben, denn auch für diese Wirkstoffe sind zilientoxische Eigenschaften seit langem bekannt (↓ 3.4.1.2) [16, 108]. Während bei letzteren die Anwendungsdauer der Fertigarzneimittel bereits auf wenige Tage beschränkt ist, beabsichtigt das BfArM erst jetzt, für BAC enthaltende Nasalia die Anwendungsdauer ähnlich zu begrenzen und die Packungsbeilage mit einem entsprechenden Warnhinweis zu versehen [3].

Die Eigenschaften der charakterisierten Fertigarzneimittel (Tab. 7) zeigen, dass es sich um annähernd isotonische, nichtviskositätserhöhte, zum Teil gepufferte Lösungen mit einem pH-Wert von 5,5 bis 6,0 handelt. Lediglich Cromo ratiopharm[®] weicht mit einer Tonizität von 69 mOsmol/kg deutlich ab.

Sind die Arzneistofflösungen mit Benzalkoniumchlorid konserviert (vgl. Tab. 6), ist eine deutliche Verminderung der Oberflächenspannung gegenüber Wasser (ca. 72,8 mN/m) zu registrieren, die durch den tensidischen Charakter von BAC bedingt ist.

Auffallend ist, dass die Routineüberprüfung auf Wechselwirkungen mit einer Mucindispersion (↑ 5.2.5.2) für die natriumcromoglicathaltigen Fertigarzneimittel einen positiven Mukoadhäsionsindex (↓ 3.3.3) ergab. Für XYLO und OXY wurden dagegen keine messbaren Effekte festgestellt.

Tabelle 7 dokumentiert die ermittelten physikalisch-chemischen Parameter der Fertigarzneimittel. Auf die Angabe der Standardabweichung der Messergebnisse wird verzichtet, da diese, mit Ausnahme der des Mukoadhäsionsindex, unter 1 % lag. Eine Angabe der Standardabweichung für den Mukoadhäsionsindex ist, durch die Vielzahl der Standardabweichungen, die in die Berechnung eingehen, nicht mehr sinnvoll.

Tabelle 7: Physikalisch-chemische Parameter der Fertigarzneimittel

Präparat	pH	Osmolalität [mOsmol/kg]	DV [mPas]	OFS [mN/m]	Dichte [g/cm ³]	M-Ix [Pa]
<i>Natriumcromoglicat</i>						
Cromo pur von ct [®]	6,08	261	0,793	63,93	1,017	2,17
Cromohexal [®]	6,82	299	0,735	43,85	1,020	2,21
Cromohexal sanft [®]	5,89	286	0,701	61,36	1,022	2,27
Cromo ratiopharm [®]	5,59	69	0,779	66,43	1,007	2,45
Vividrin [®]	5,53	272	0,836	37,15	1,022	1,81
<i>Xylometazolinhydrochlorid</i>						
Nasan [®]	6,07	281	0,772	37,61	1,010	0
Xylo comod [®]	6,04	260	0,751	58,08	1,014	0,39
Nasentropfen E ratiopharm [®]	5,75	265	0,720	37,16	1,005	0
Xylo von ct [®]	5,86	257	0,716	31,18	1,000	0
<i>Oxymetazolinhydrochlorid</i>						
Nasivin [®]	5,96	288	0,731	37,89	1,015	0

DV Dynamische Viskosität

OFS Statische Oberflächenspannung

M-Ix Mukoadhäsionsindex (D = 25, 50, 75, 100 1/s)

Die für DSCG, mit einer durch den Probenansatz determinierten Konzentration von 5 mg je Gramm Probengemisch, ermittelten Mukoadhäsionsindizes liegen in der Größenordnung der Werte, die für mukoadhäsive Polymere in zum Teil höheren Konzentrationen durch Oechsner [89] ermittelt wurden. Beispielhaft sei der Mukoadhäsionsindex für Polyacrylsäure 2 mg/ml, einem klassischen Mukoadhäsivum, mit 1,62 Pa angeführt.

Die für die einzelnen Schergeschwindigkeiten (25, 50, 75, 100 1/s) ermittelten Viskositäten (↑ 5.2.5.2) der natriumcromoglicathaltigen FAM/Mucin-Gemische unterschieden sich signifikant von denen des Mucin/Puffer-Gemisches (*t*-Test).

4.2.1.2 In-vitro-Permeation

Die Verteilung eines gelösten Stoffes zwischen zwei flüssigen Kompartimenten, die durch eine Membran getrennt sind, kann als Diffusion durch eine, in eine oder aus einer Schicht betrachtet werden. Die dem Verteilungsverhalten zugrunde liegenden Gesetze sind in jedem Fall die Fick'schen Diffusionsgesetze. Sie werden bei einzuhaltenden Versuchsbedingungen entsprechend der jeweiligen Fragestellung aufgelöst [78].

Ist lediglich der Durchtritt durch eine Barriere (biologische oder synthetische Membran) von Interesse, wird folgende Ableitung benutzt und der Permeabilitätskoeffizient bestimmt:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot 60 \cdot A \cdot c_0}$$

(Gl. 11)

Der apparente Permeabilitätskoeffizient P_{app} [cm/s] stellt dabei die Geschwindigkeit des Stoffdurchtrittes durch die Membran dar und ergibt sich aus der gesamten permeierten Wirkstoffmenge ΔQ [µg] zur Zeit t [min], der Permeationsfläche A [cm²], der Ausgangskonzentration c_0 [µg] und dem Umrechnungsfaktor von Minuten in Sekunden. Der Quotient $\Delta Q/\Delta t$ [µg/min] stellt dabei die nach Erreichen des „steady-state“ konstante Permeabilitätsrate (Flux) dar und kann der graphischen Darstellung „permeierte Arzneistoffmenge gegen Zeit“ als Steigung der resultierenden Geraden entnommen werden [133].

Im „quasi-stationären“ Zustand (steady-state) sind zwar die Konzentrationen im Donator- und Akzeptorkompartiment verschieden, ihr Verhältnis zueinander ist aber durch den konstanten Konzentrationsgradienten in der Barriere zeitunabhängig. Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Beziehung ist eine ausschließlich **membrangesteuerte** Diffusion. Diese liegt vor, wenn

- Sink-Bedingungen herrschen, d. h. die Konzentration im Akzeptor niedrig gehalten wird (Sink-Bedingungen gelten als gegeben, wenn die Arzneistoffkonzentration zu keiner Zeit 10-25 % der Sättigungskonzentration erreicht.),
- die Konzentration im Donator praktisch konstant bleibt,
- die ruhenden Schichten an der Grenzfläche (Membran) bei heftiger Konvektion der Flüssigkeit in beiden Kompartimenten keinen Einfluss ausüben.

Der auf diese Weise ermittelte P_{app} charakterisiert das Transportvermögen eines zellulär hoch differenzierten Gewebes für einen Arzneistoff und ist eine zusammengesetzte Größe aus dem Diffusionskoeffizienten D_{app} und den Verteilungskoeffizienten VK (Membran, Flüssigkeit) des Arzneistoffes [78, 134].

Der absolute Permeabilitätskoeffizient P wird durch den Bezug auf die Membrandicke erhalten [135]. Da jedoch für die durchgeführten Permeationsstudien stets die gleiche

biologische oder synthetische Membran verwendet wurde, werden die ermittelten apparenten Permeabilitätskoeffizienten zur Auswertung herangezogen.

Jeder der im Folgenden aufgeführten Permeationsversuche wurde sowohl mit exzidiierter Rindernasenschleimhaut als biologischer Membran als auch mit dem synthetischen Nephrophan[®] (regenerierte Cellulose) als Permeationsbarriere durchgeführt. Der Nephrophan[®]-Versuch stellt dabei eine sinnvolle Ergänzung der Permeationsstudien mit dem biologischen Material dar, da er nur den Einfluss der Formulierung auf das Permeationsverhalten des Arzneistoffes erfasst.

Beide Barrieren sind hinsichtlich ihrer Porengröße und ihrer Dicke durchaus vergleichbar. Für Moleküle mit Radien über 1 nm sind die „Poren“ der biologischen Membran nicht mehr permeabel [51], während für Nephrophan[®] ca. 2,4 nm als Porengröße angegeben werden [136]. Die Dicke der gequollenen synthetischen Membran kann auf 40 bis 55 µm geschätzt werden (↑ 4.2.2.3), während Corbo et al. [23] für Rindernasenschleimhaut ca. 53 µm angeben. Die „Durchlässigkeit“ der Nephrophan[®]-Membran für die drei Arzneistoffe wurde überprüft: nach entsprechender Zeit lag eine Gleichverteilung der Substanzen in beiden Kompartimenten vor (Daten nicht dargestellt).

Permeation durch Rindernasenschleimhaut

Die Permeabilitätskoeffizienten der drei Arzneistoffe aus ihren Fertigarzneimitteln liegen in der für solche als „leaky“ bezeichneten Gewebe beschriebenen Größenordnung von 10^{-5} cm/s [13, 23, 42, 137]. Ein linearer Zusammenhang der Auftragung „permeierte Menge gegen Zeit“ lag vor.

Prozentual betrachtet, permeierte aus den XYLO enthaltenden Fertigarzneimitteln die quantitativ größte Arzneistoffmenge in der Versuchszeit. Während die Formulierungsparameter mit Ausnahme von Xylo comod[®], dem konservierungsmittelfreien Präparat mit Sorbitol als Isotonisierungsmittel, weder tendenziell noch signifikant einen Einfluss auf das Permeationsverhalten von XYLO zeigen, sind bei DSCG deutliche Unterschiede in der permeierten Arzneistoffmenge in Abhängigkeit von der Formulierung festzustellen.

Im Falle von Vividrin[®] ist zu postulieren, dass das enthaltene Polysorbat 80 einen Membraneinfluss ausübt [36]. Dieser für Vividrin[®] gefundene Effekt erwies sich als signifikant beim Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten mittels ANOVA. Bei Cromoratiopharm[®] nimmt vermutlich die niedrige Tonizität des Fertigarzneimittels Einfluss. Anhand der unter 4.2.2 bzw. 4.3.1 untersuchten Eigenrezepturen soll der Einfluss einzelner Formulierungsparameter bestätigt bzw. näher charakterisiert und zugeordnet werden.

Tabelle 8 zeigt die Permeationsdaten der Arzneistoffe aus ihren Fertigarzneimitteln für Rindernasenschleimhaut.

Tabelle 8: Permeation der Arzneistoffe aus den Fertigarzneimitteln durch Rindernasen schleimhaut

Präparat	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [µg]	Q_{60} [%]
Natriumcromoglicat (20 mg/ml)			
Cromohexal [®]	$1,08 \pm 0,23$	$1523,48 \pm 619,33$	2,54
Cromohexal sanft [®]	$1,11 \pm 0,19$	$1501,04 \pm 742,68$	2,50
Cromo pur von ct [®]	$1,27 \pm 0,13$	$1578,65 \pm 419,45$	2,63
Cromo ratiopharm [®]	$0,49 \pm 0,19$	$758,14 \pm 529,33$	1,26
Vividrin [®]	$2,68 \pm 0,36^*$	$3810,86 \pm 1187,54$	6,04
Xylometazolinhydrochlorid (1 mg/ml)			
Nasentropfen E ratiopharm [®]	$1,85 \pm 0,31$	$127,35 \pm 44,29$	3,88
Xylo comod [®]	$2,86 \pm 0,78$	$213,42 \pm 147,18$	6,50
Nasan [®]	$1,74 \pm 0,60$	$135,33 \pm 113,78$	4,12
Xylo von ct [®]	$1,99 \pm 0,35$	$144,15 \pm 54,39$	4,39
Oxymetazolinhydrochlorid (0,5 mg/ml)			
Nasivin [®]	$0,92 \pm 0,051$	$25,19 \pm 0,47$	1,68

* signifikant verschieden (ANOVA) von den P_{app} der anderen FAM mit dem gleichen Arzneistoff

Permeation durch Nephrophan[®]

Das Permeationsverhalten der Arzneistoffe aus ihren FAM durch Nephrophan[®] charakterisieren die Daten in Tabelle 9.

Die Permeabilitätskoeffizienten von OXY und XYLO für die synthetische Membran unterscheiden sich nicht voneinander; auch nicht in Hinblick auf die Formulierungsparameter (ANOVA). Die Permeabilitätskoeffizienten von DSCG hingegen sind kleiner als die von OXY und XYLO. Ein signifikanter Formulierungseinfluss im Falle von Vividrin[®] und Cromo ratiopharm[®] ist festzustellen (ANOVA).

Vergleichende Betrachtung

Folgendes kann bei der vergleichenden Betrachtung der Permeationsdaten durch natürliches und synthetisches Gewebe festgestellt werden:

- Die Permeabilitätskoeffizienten beider Membranen sind vergleichbar.
- Der Unterschied im Permeationsverhalten von OXY und XYLO an der biologischen Membran scheint durch die Substanzen selbst zu entstehen (da $P_{app \text{ Neph. OXY}} = P_{app \text{ Neph. Xylo}}$). Das Isotonisierungsmittel Sorbitol und/oder das Konservierungsmittel BAC zeigen dabei einen zusätzlichen Einfluss ($P_{app \text{ Xylo comod}} >$ als der der anderen FAM).

- Für DSCG bestätigen die Nephrophan[®]-Versuche den Formulierungseinfluss auf das Permeationsverhalten der Substanz. Während an der biologischen Membran der Effekt von Polysorbat durch dessen membranaktiven (tensidischen) Charakter überwiegt und zur Permeabilitätssteigerung führt, wirkt sich die anzunehmende mizellare Lösung des Tensids an der synthetischen Membran permeationsbehindernd aus. Die hypoosmotische Zubereitung Cromo ratiopharm[®] übt dagegen auf beide Barrieren den gleichen Einfluss aus. Dabei kann der durch das osmotische Gefälle entstehende Flüssigkeitsstrom entgegen der Permeationsrichtung von DSCG möglicherweise dessen Permeation behindern. An der biologischen Membran scheint kein schädigender und damit „porenöffnender“ Einfluss auf die epithelialen Zellen durch das hypoosmotische Milieu im Donator vorzuliegen.

Tabelle 9: Permeation der Arzneistoffe aus den Fertigarzneimitteln durch Nephrophan[®]

Präparat	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q ₆₀ [µg]	Q ₆₀ [%]
Natriumcromoglicat (20 mg/ml)			
Cromohexal [®]	1,77 ± 0,051	2405,05 ± 122,58	4,01
Cromohexal sanft [®]	1,83 ± 0,037	2527,52 ± 101,35	4,21
Cromo pur von ct [®]	2,01 ± 0,050	2787,91 ± 118,61	4,65
Cromo ratiopharm [®]	1,46 ± 0,11*	2156,66 ± 284,17	3,59
Vividrin [®]	1,41 ± 0,069*	1925,75 ± 165,59	3,38
Xylometazolinhydrochlorid (1 mg/ml)			
Nasentropfen E ratiopharm [®]	2,89 ± 0,052	218,82 ± 7,39	6,66
Xylo comod [®]	2,52 ± 0,12	192,26 ± 15,45	5,85
Nasan [®]	2,66 ± 0,18	203,60 ± 6,20	6,20
Xylo von ct [®]	2,88 ± 0,070	216,28 ± 14,32	6,58
Oxymetazolinhydrochlorid (0,5 mg/ml)			
Nasivin [®]	2,70 ± 0,090	217,14 ± 13,90	6,25

* signifikant verschieden (ANOVA) von den P_{app} der anderen FAM mit dem gleichen Arzneistoff

4.2.1.3 Mucinwechselwirkungen

Ein Nachteil der In-vitro-Permeationsstudien an isoliertem nasalem Gewebe liegt darin, dass die mukoziliäre Clearance als ein auf das nasale Absorptionsgeschehen stark Einfluss nehmender Parameter nicht erfasst wird [43]. Die hier durchgeführten Wechselwirkungsstudien mit einer Mukusmodelldispersion (Mucin) sollen diese Lücke ansatzweise schließen; denn sie geben Aufschluss über den Einfluss der Arzneistoffformulierung auf die

rheologischen (physikalischen) Parameter der Mucinmodelldispersion (Viskosität und Elastizität), die für eine optimale mukoziliäre Clearance von großer Bedeutung sind.

Wie bereits bei den methodischen Grundlagen erwähnt (↓ 3.3.3), ist die Messung der Scherviskosität eine Möglichkeit, die Wechselwirkungen von Arzneistoffzubereitungen mit dem Mukus oder stellvertretend mit seiner Modelldispersion (Mucin) zu quantifizieren. Eine mukoadhäsive Wechselwirkung der untersuchten Formulierung mit dem Mukus äußert sich in einer Scherviskosität des Gemisches, die größer ist als der Wert, der sich aus der Addition der Einzelviskositäten von Mucindispersion und Zubereitung ergibt. Der Mukoadhäsionsindex bringt diese überadditive Viskositätszunahme, die gegen die vorgegebene Scherbelastung relativiert wurde, zum Ausdruck.

Da die elastischen Eigenschaften der Mucindispersion bei der Bestimmung der Scherviskosität nicht gesondert erfasst werden, ist durch die einfache Viskositätsbestimmung kein Rückschluss auf die Art der vorliegenden Wechselwirkungen zwischen Mucinglykoproteinen und Formulierung möglich. Es kann somit keine Aussage zur Veränderung des entscheidendsten rheologischen Parameters des Mukus, der Elastizität, in Hinblick auf eine Veränderung der MCC getroffen werden [138].

Der Einfluss der FAM auf die rheologischen Parameter einer Modelldispersion wurde daher in der vorliegenden Arbeit mittels einer oszillationsrheologischen Methode untersucht, die das gleichzeitige Erfassen viskoser (Verlustmodul) und elastischer Anteile (Speichermodul) ermöglicht. Um den theoretischen Hintergrund der oszillationsrheologischen Untersuchungen, die ausführlich im Abschnitt 4.3.3.1 behandelt werden, nicht vorweg nehmen zu müssen, wurden hier die bei einer bestimmten Frequenz ($\omega = 16,9 \text{ 1/s}$) ermittelten Beträge der Komplexen Viskositäten $|\eta^*|$ auf den Mukoadhäsionsindex (↓ 4.2.1.1) umgerechnet. Abbildung 15 zeigt die auf diese Weise ermittelten Mukoadhäsionsindizes $M-Ix$ der untersuchten Fertigarzneimittel.

Die oszillationsrheologischen Untersuchungen (↑ 5.2.5.1) erhärteten die bereits bestehende Vermutung, dass die natriumcromoglicathaltigen FAM mit der Mucindispersion signifikant wechselwirken. Der Vergleich von den für DSCG (5 mg/g)¹ bei Verwendung der Handelspräparate ermittelten Mukoadhäsionsindizes ($\omega = 16,9 \text{ 1/s}$) mit denen von Oechner et al. [89] angegebenen (z. B. Na-Carboxymethylcellulose (10 mg/ml): $M-Ix = 8,22 \text{ Pa}$, Polyacrylsäure (2 mg/ml): $M-Ix = 1,62 \text{ Pa}$ ($D = 25, 50, 75, 100 \text{ 1/s}$)) verdeutlicht, dass das nichtmakromolekulare DSCG deutliche „adhäsive“ Eigenschaften besitzt. Eine Beeinflussung der MCC nach nasaler Applikation natriumcromoglicathaltiger Zubereitungen ist aufgrund der ermittelten Wechselwirkung mit den Mucinglykoproteinen nicht auszuschließen. Der beobachtete viskositätserhöhende Effekt von DSCG unterscheidet sich mit Ausnahme der

¹ Die Konzentration von 5 mg bezieht sich auf Gramm Probengemisch mit Mucin. Die Verdünnung der DSCG-Konzentration im Vergleich zu den Handelspräparaten um den Faktor 1:4 ergibt sich aus dem Probenansatz (↑ 5.2.5).

tendenziellen Erniedrigung im Falle von Cromohexal[®] für die einzelnen FAM nicht voneinander (ANOVA). XYLO und OXY enthaltende FAM zeigten wiederum keinen Effekt auf die untersuchten rheologischen Parameter der Mucindispersion.

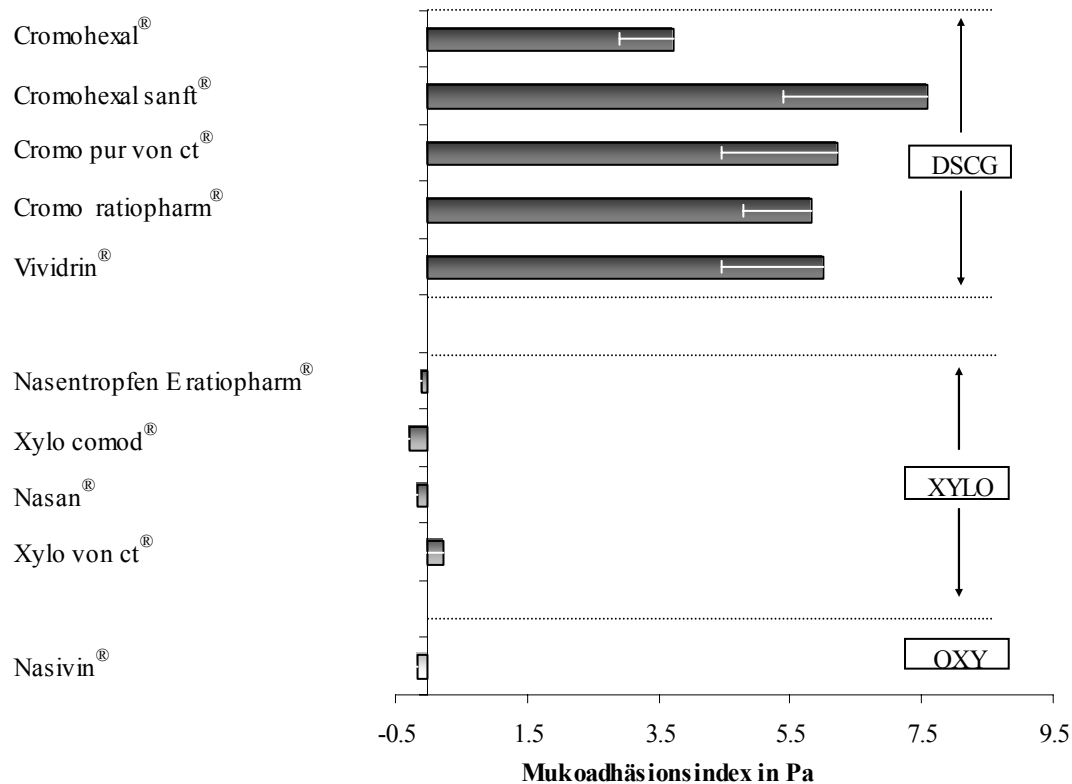


Abbildung 15: Mukoadhäsionsindizes der FAM ($\omega = 16,9$ 1/s)

Die Mucinwechselwirkung von DSCG ist mit Hilfe der durchgeführten oszillationsrheologischen Untersuchungen bestätigt worden. Da die angegebenen Mukoadhäsionsindizes (Abb. 15) lediglich die „Adhäsivität“ der Substanz bei einer Frequenz ($\omega = 16,9$ 1/s) des aufgenommenen Frequenzsweeps anhand der rheologischen Größe „Komplexe Viskosität“ belegen, ist an dieser Stelle keine Aussage zur Einflussnahme der Formulierungsparameter möglich. Weitere oszillationsrheologische Untersuchungen mit den arzneistoffhaltigen und arzneistofffreien Zubereitungen sollen zeigen, ob und in welchem Maße der „adhäsive“ Effekt von DSCG durch Formulierungsparameter beeinflusst wird und ob diese selbst die rheologischen Parameter der Mucindispersion verändern. Dabei werden die aussagefähigeren oszillationsrheologischen Größen des gesamten Frequenzsweeps zur Auswertung gelangen.

4.2.2 Eigenrezepturen

Im Folgenden wurde das Permeationsverhalten der Arzneistoffe aus den Eigenrezepturen unter Veränderung der Tonizität, des Isotonisierungsmittels und des Einflusses der Hilfsstoffe EDTA und/oder BAC untersucht. Weiterhin sollten oszillationsrheologische Studien den Hilfsstoffeinfluss auf die rheologischen Parameter der Modelldispersion selbst sowie die Wechselwirkungen von DSCG mit der Mucindispersion charakterisieren.

4.2.2.1 *In-vitro-Permeation*

Für die durchgeführten Permeationsstudien wurde als Donatormedium generell Phosphatpuffer pH 6,0 (PBS) verwendet, der, soweit nicht anders ausgewiesen, isoton war (ca. 280 mOsmol/kg). Akzeptorseitig und für die Equilibrierung des Gewebes wurde physiologischer Puffer pH 7,4 (EBS) verwendet. Die molare Konzentration der verwendeten Arzneistoffe betrug stets 0,0039, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen und Konzentrationseinflüsse zu eliminieren¹. Der statistische Vergleich (*t*-Test) der P_{app} für die einzelnen Arzneistoffe bezieht sich immer auf das isotone System PBS 6,0 mit 0,0039 M Arzneistoff (*Referenz*).

Bei Verwendung der biologischen Membran traten relativ hohe Variationskoeffizienten für P_{app} auf, was aber ähnlich auch für parazelluläre Markersubstanzen an diesem Gewebe beschrieben wurde [23, 137]. Das Finden statistischer Signifikanzen wird jedoch dadurch eingeschränkt. Histologische Untersuchungen an exzidiertem nasalem Gewebe ergaben, dass bereits unbehandeltes Gewebe große Unterschiede im Öffnungs- und Verteilungsverhalten der Tight-junctions aufweist [55]. Schmidt et al. [42] geben bei der Bestimmung des parazellulären Permeationsverhaltens von Peptiden an Rindernasenschleimhaut Variationskoeffizienten von bis zu 30 % als gut reproduzierbar an.

Reardon et al. [139] konnten nach dem Einspannen von nasaler Mukosa in Side-Bi-SideTM-Diffusionszellen über den Versuchszeitraum keine drastischen morphologischen Veränderungen der Mukosa finden. Zilien und Mikrovilli des Epithels waren intakt, der junctionale Komplex zeigte keine Veränderung. Nach einer Vorinkubationszeit und während einer Versuchsdauer von 90 min veränderten sich die elektrophysiologischen Parameter des Epithels nicht.

Anderberg et al. [140] geben an, dass das Entfernen des physiologischen Puffers (EBS pH 7,4) nach der Equilibrierungsphase keinen Einfluss auf die Vitalität und die

¹ Die nachgestellten, zur Testung gelangten Eigenrezepturen sind mit Ausnahme der XYLO-haltigen Lösungen den FAM in Bezug auf die Arzneistoffkonzentration nur qualitativ nachempfunden. Im Vordergrund standen vergleichende Untersuchungen, für die es galt, den Konzentrationseinfluss auszuschalten.

parazellulären Transportmechanismen der biologischen Membran nimmt. Der physiologische Puffer akzeptorseitig genügt, um z. B. die physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen in der Membran aufrecht zu erhalten. Phosphatgepufferte Systeme werden für Studien mit exzidiertem tierischem Gewebe empfohlen [13].

A Permeation aus isotonem Phosphatpuffer

Tabelle 10 zeigt die gewonnenen Daten nach Permeation der Arzneistoffe aus PBS durch die beiden Membranen Rindernasenschleimhaut und Nephrophan[®]. In Abbildung 16 ist der Permeationsverlauf für die biologische Membran graphisch dargestellt.

Zusätzlich zu den Permeationscharakteristika der drei Arzneistoffe sind im Falle der Rindermukosa die von Fluorescein-Natrium (FLU), einer **parazellulären Markersubstanz** [141, 142], angegeben, die im Rahmen der Vorinkubationsversuche mit Natriumcromoglicat unter 4.3.1.2 ermittelt wurden. Als eine solche Substanz ist Fluorescein-Natrium eine Verbindung, die einerseits ausschließlich parazellulär permeiert und andererseits nicht mit den Bestandteilen der biologischen Membran wechselwirkt. Der Vergleich der Permeationsdaten der Arzneistoffe mit denen eines Markers erlaubt eine Aussage darüber, ob neben der Molekülmasse arzneistoffspezifische Faktoren das Permeationsverhalten beeinflussen. Allerdings muss der Vergleich bei den im Folgenden durchgeführten Untersuchungen unter der Einschränkung erfolgen, dass FLU in einer Konzentration von 100 μM in EBS pH 7,4, anstelle des isotonischen Phosphatpuffers pH 6,0, für die Untersuchung des Permeationsverhaltens verwendet wurde, was sich aus der Fragestellung der Versuche unter 4.3.1.2 ergab.

Tabelle 10: Permeation der Arzneistoffe und Fluorescein-Natrium ($c = 100 \mu\text{M}$) durch Rindernasenschleimhaut und Nephrophan[®]

Arzneistoff	$P_{\text{app}} \times 10^{-5} [\text{cm/s}]$	$Q_{60} [\mu\text{g}]$	$Q_{60} [\%]$
Rindernasenschleimhaut			
DSCG	$1,41 \pm 0,23$	$185,09 \pm 74,42$	3,08
XYLO	$1,69 \pm 0,18$	$117,78 \pm 35,88$	3,59
OXY	$0,78 \pm 0,11$	$88,12 \pm 11,30$	2,54
FLU ¹	$1,08 \pm 0,02$	$2,52 \pm 0,62$	2,25
Nephrophan[®]			
DSCG	$2,68 \pm 0,13$	$379,65 \pm 24,03$	6,35
XYLO	$2,76 \pm 0,16$	$210,28 \pm 13,41$	6,40
OXY	$2,72 \pm 0,17$	$214,65 \pm 13,08$	6,19

¹ Permeation aus EBS

* Signifikanz t -Test, ** Signifikanz ANOVA

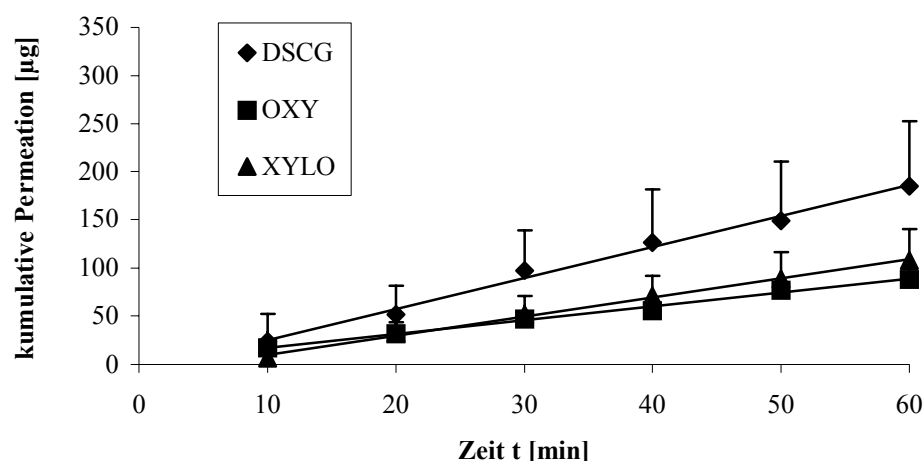


Abbildung 16: Permeation der Arzneistoffe (0,0039 M) durch Rindernasenschleimhaut

Permeation durch Rindernasenschleimhaut

Die drei Arzneistoffe (Abb. 16) sowie der parazelluläre Marker FLU (nicht dargestellt) sind nach Versuchsbeginn ohne nennenswerte zeitliche Verzögerung (Lag-time) im Akzeptorkompartiment detektierbar. Für die Substanzen ist daher der parazelluläre Transportmechanismus durch die biologische Membran als dominierend anzusehen, wofür auch ihre Hydrophilie und ionische Ladung bei einem pH-Wert von 6,0 (siehe Tab. 4) sprechen. Da transzelluläre Transportmechanismen durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran deutlich langsamer vonstatten gehen [54], erscheinen transzellulär transportierte Substanzen häufig mit einer deutlichen zeitlichen Verzögerung im Akzeptorkompartiment und sind zudem zumeist lipophile und nichtionische Verbindungen.

Für die Permeation homologer Reihen von Substanzen (z. B. fluoreszenzmarkierte Dextrane mit verschiedenen Molekülmassen [61, 63] und Babbitursäurederivate mit verschiedener Lipophilie [143]) konnte in Hinblick auf die Permeabilität der nasalen Mukosa festgestellt werden, dass im Allgemeinen die Permeabilität mit steigender Lipophilie der permeierenden Substanz zunimmt und mit steigender Molekülmasse sinkt.

Bei den zwei Strukturanalogen OXY und XYLO lässt sich die signifikante Zunahme (*t*-Test) der permeierten Menge von XYLO, verglichen mit OXY, auf dessen höhere Lipophilie bei geringfügig kleinerer Molekülmasse zurückführen. In Analogie dazu wurde die nasale Bioverfügbarkeit eines Monohydroxyderivates von Progesteron deutlich kleiner gefunden als die von Progesteron [144]. Es ist anzunehmen, dass XYLO neben dem parazellulären auch dem transzellulären Transportprozess folgen kann. Hussain et al. [145] postulieren, dass bei relativen Molekülmassen < 300 die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanz in Hinblick auf deren Permeabilität weniger Einfluss nehmen als die Größe des Moleküls.

Obwohl DSCG eine deutlich größere Molekülmasse bei geringerer Lipophilie z. B. verglichen mit OXY besitzt (Tab. 4) und die negativ geladene nasale Mukosa¹ eine gewisse „Permeaselektivität“ für positiv geladene Substanzen aufweist [22, 146], permeiert DSCG in einem signifikant (*t*-Test) größeren Anteil als OXY. Der von Grass et al. [147] vermutete selbstenhancende Effekt von DSCG könnte dafür die Ursache sein. Der Vergleich mit dem P_{app} der parazellulären Markersubstanz FLU unterstützt diese Vermutung. FLU (M_r 354) besitzt ebenso wie OXY eine kleinere Molekülmasse als DSCG und mit einem VK in EBS von $0,720 \pm 0,161$ einen größeren Anteil unpolarer Strukturen im Molekül, verglichen mit OXY und DSCG. Während der P_{app} von FLU, verglichen mit dem von OXY, die allgemeinen Zusammenhänge zwischen Lipophilie bzw. Molekülmasse und parazellulärem Permeationsverhalten widerspiegelt, weist der tendenziell höhere P_{app} von DSCG auf ein von diesen Zusammenhängen abweichendes Permeationsverhalten hin. Allerdings muss bei der vergleichenden Betrachtung der Werte von P_{app} aller drei Arzneistoffe und des P_{app} von FLU beachtet werden, dass es sich bei den aufgezeigten Unterschieden lediglich um Tendenzen handelt (ANOVA).

Permeation durch Nephrophan[®]

Durch die synthetische Membran konnten für die drei Arzneistoffe nahezu die gleichen P_{app} ermittelt werden. Sie unterscheiden sich weder tendenziell noch signifikant voneinander (ANOVA). Die zunehmenden Verteilungskoeffizienten VK (vgl. Tab. 5) der beiden basischen Verbindungen OXY und XYLO mit steigendem pH (donatorseitig: PBS pH 6,0, akzeptorseitig: EBS pH 7,4) beeinflussen die Permeation durch die Mukosa nicht.

Während für die Permeation von DSCG (20 mg/ml = 0,039 M) durch Nephrophan[®] aus den Fertigarzneimitteln verglichen mit OXY und XYLO (0,05 bzw. 0,1 % (m/V)) deutlich kleinere Permeabilitätsraten ermittelt wurden (Tab. 9), zeigt sich dieser Effekt bei den Permeationsstudien mit den Eigenrezepturen (0,0039 M Arzneistoff) an der synthetischen Membran nicht und ist somit offensichtlich konzentrationsabhängig. Neben den konzentrationsabhängigen Effekten auf die Permeation von DSCG ist eine Einflussnahme der Formulierungsparameter bei den FAM zu vermuten.

Die Ergebnisse der folgenden Permeationsversuche durch Nephrophan[®] werden im Ergebnis- und Diskussionsteil dieser Arbeit nur noch dann zahlenmäßig dargestellt, wenn ein signifikanter Unterschied zur jeweiligen Referenz auftrat. Im Anhang 7.4 sind die Permeationsdaten aller Nephrophan[®]-Versuche dokumentiert.

¹ Die negative Ladung der Mukosa ergibt sich aus aktiven Transportmechanismen von Ionen, die zu einer Ungleichverteilung von vor allem Chloridionen zwischen serosaler und mukosaler Seite führen.

B Einfluss von Benzalkoniumchlorid und EDTA

EDTA ist ein klassischer Enhancer für parazelluläre Transportprozesse [51]. Die Enhancerfunktion beruht auf der Fähigkeit zur Komplexbildung der extrazellulären Ca^{2+} -Ionen, die an der Regulation und Integrität der TJ ursächlich beteiligt sind [148]. Auf dieser Eigenschaft basiert letztlich auch die häufige Anwendung der Kombination mit dem oberflächenaktiven BAC, wodurch die Penetrationsfähigkeit des Konservierungsmittels in den Mikroorganismus erhöht werden soll. Außerdem werden intrazelluläre Proteine und calciumabhängige Enzyme, die mit dem junctionalen Komplex in Verbindung stehen, durch die Ca^{2+} /EDTA-Chelatbildung in ihrer Aktivität bzw. Funktion beeinträchtigt, woraus darüber hinaus eine bessere transzelluläre Permeabilität resultiert [52, 149].

Durch EDTA (0,1 %) ist eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität der Mukosa, z. B. für FITC-Dextran um das Sechsfache, ermittelt worden [150], wobei die schädigende Wirkung auf die epitheliale Membran vergleichsweise gering war [61, 150]. BAC zeigt als tensidische Substanz membranaktive Potentiale [151], die durch Schädigung der epithelialen Membran hauptsächlich transzelluläre Transportprozesse betreffen.

Tabelle 11 gibt die ermittelten Daten der Permeationsstudie mit DSCG, XYLO und OXY durch **Rindernasenschleimhaut** unter Einfluss der Formulierungsparameter EDTA (0,1 % (m/V)) und BAC (0,01 % (m/V)) sowie deren Kombination wieder.

Einfluss von EDTA

Der Zusatz von EDTA führt bei allen drei Arzneistoffen erwartungsgemäß zu einer größeren permeierten Arzneistoffmenge durch **Rindermukosa**, die im Falle von OXY und XYLO sogar signifikant erhöht ist. Neben der Abhängigkeit der EDTA-Enhancerwirkung von EDTA-Konzentration und der Zeit [57] spielen auch die Hydrophilie und die Molekülmasse des betreffenden Arzneistoffes eine Rolle [150, 152]. Demzufolge kann die signifikant (*t*-Test) größere Effektivität von EDTA auf den P_{app} von OXY, verglichen mit XYLO, mit dem stärker hydrophilen Charakter dieses Arzneistoffes zusammenhängen.

Für den weniger deutlichen enhancenden EDTA-Effekt auf die Permeabilität der biologischen Membran im Falle von DSCG lassen sich zwei Ursachen diskutieren. Zum einen kann die beschriebene Selektivität der Enhancerwirkung bezüglich einer Molekülmasse des Arzneistoffes innerhalb enger Grenzen [139, 153] eine Rolle spielen, zum anderen schränken möglicherweise die selbstenhancenden Effekte von DSCG [147] die Permeabilitätsverbesserung durch EDTA ein. Die permeabilitätsverbessernde Wirkung oder auch die Effektivität eines Enhancers steigt mit der Erhöhung der Enhancerkonzentration nur bis zu einem Plateau [150], das möglicherweise durch die Kombination von EDTA mit dem

selbstenhancenden DSCG bei den für die Permeationsstudien verwendeten Konzentrationen beider Substanzen bereits erreicht ist.

Einfluss von BAC

Der Zusatz von BAC verändert die P_{app} von OXY und XYLO, verglichen mit der jeweiligen Referenz, kaum, da die membranaktiven Eigenschaften der Substanz hauptsächlich auf transzelluläre Transportprozesse Einfluss nehmen, die für die hydrophilen, geladenen Arzneistoffe eine untergeordnete Rolle spielen. Bei dem ebenfalls stark hydrophilen DSCG könnte für die signifikante Abnahme von P_{app} die Bildung eines Ionenpaares [154] die Ursache sein, das sowohl aufgrund seiner Größe als auch aufgrund der Behinderung der selbstenhancenden Fähigkeiten von DSCG dessen Permeation einschränkt.

Tabelle 11: Einfluss von EDTA und BAC sowie deren Kombination auf die Permeation durch Rindernasenschleimhaut

Zusatz	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [µg]	Q_{60} [%]
<i>Natriumcromoglicat</i>			
<i>Referenz (ohne)</i>	<i>1,41 ± 0,23</i>	<i>185,09 ± 74,42</i>	<i>3,08</i>
EDTA	2,17 ± 0,42	274,75 ± 168,26	4,58
BAC	0,50 ± 0,09*	53,16 ± 18,73	0,89
EDTA/BAC	1,76 ± 0,50	215,38 ± 123,22	3,59
<i>Xylometazolinhydrochlorid</i>			
<i>Referenz (ohne)</i>	<i>1,69 ± 0,18</i>	<i>117,78 ± 35,88</i>	<i>3,59</i>
EDTA	3,43 ± 0,64*	35,97 ± 46,74	7,73
BAC	1,38 ± 0,07	100,86 ± 14,38	3,07
EDTA/BAC	1,54 ± 0,28	129,74 ± 50,50	3,95
<i>Oxymetazolinhydrochlorid</i>			
<i>Referenz (ohne)</i>	<i>0,78 ± 0,11</i>	<i>88,12 ± 11,30</i>	<i>2,54</i>
EDTA	4,91 ± 1,14*	492,77 ± 192,77	14,18
BAC	0,93 ± 0,24	99,89 ± 47,98	2,88
EDTA/BAC	2,21 ± 0,5*	185,64 ± 75,23	5,34

* Signifikanz

Kombination

Während die membranaktiven Eigenschaften von BAC das Permeationsverhalten von OXY und XYLO kaum beeinflussen, nehmen sie auf die Effektivität der enhancenden Wirkung von EDTA für diese beiden Arzneistoffe offensichtlich einen deutlich permeabilitätsreduzierenden Einfluss ($P_{\text{app OXY/XYLO EDTA}}$ signifikant $> P_{\text{app OXY/XYLO EDTA/BAC}}$ (t -Test)). Die Schädigung der Integrität der Mukosa mit Störung junctionaler Regulationsprozesse ist dafür eine mögliche Erklärung.

Die Tatsache, dass im Falle von DSCG hingegen trotz des entstehenden Ionenpaares mit BAC bei Verwendung der Kombination BAC/EDTA eine signifikante Zunahme (t -Test) des P_{app} im Vergleich mit dem Zusatz von BAC allein auftritt, stützt die Vermutung, dass eine Behinderung der selbstenhancenden Fähigkeit von DSCG durch die Bildung dieses Ionenpaares vorliegt. Die membranschädigende Wirkung von BAC hingegen ist durch das gebildete Ionenpaar vermutlich in diesem Fall weniger stark ausgeprägt. Die permeabilitätsfördernden Eigenschaften des Enhancers EDTA treten ohne den selbst-enhancenden DSCG-Anteil mehr in den Vordergrund.

Die ergänzenden Versuche mit der **synthetischen Membran** zeigten weder signifikant noch tendenziell eine Einflussnahme der beiden Hilfsstoffe auf das Permeationsverhalten der Arzneistoffe (Daten in 7.4 dokumentiert). Für alle Effekte, die an der biologischen Membran auftreten, sind somit die Wechselwirkungen der Arzneistoffe und/oder Hilfsstoffe mit derselben verantwortlich.

C Einfluss der Tonizität

Der Formulierungsparameter Tonizität nimmt vor allem über die Integrität der biologischen Membran auf das Permeationsgeschehen Einfluss. Eine hypotonische Lösung wird durch den angestrebten Ausgleich der osmotischen Druckverhältnisse mit dem umgebenen Milieu zum Schwellen der epithelialen Zellen, eine hypertonische dagegen zu deren Schrumpfen führen [155, 156]. Dabei reagiert die nasale Mukosa im Bereich von 0 bis 200 mOsmol/kg empfindlich auf nichtisotonische hypotone Verhältnisse. Pujara et al. [56] demonstrierten das anhand der Freisetzung von intrazellulären Markersubstanzen.

Für die folgenden Permeationsstudien wurde donatorseitig Phosphatpuffer pH 6,0 mit verschiedenen Tonizitäten verwendet. Der Akzeptor hingegen wurde wiederum mit isotonischem EBS pH 7,4 befüllt. Es wurde der Einfluss eines **stark hypotonischen** (70 mOsmol/kg), eines **schwach hypotonischen** (170 mOsmol/kg) und eines **schwach hypertotonischen** (350 mOsmol/kg) Systems untersucht. Tabelle 12 listet die gewonnenen Permeationsdaten für Rindernasenschleimhaut auf.

Tabelle 12: Einfluss der Tonizität auf die Permeation durch Rindernasenschleimhaut

Tonizität	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [µg]	Q_{60} [%]
<i>Natriumcromoglicat</i>			
Referenz (isoton)	1,41 ± 0,23	185,09 ± 74,42	3,08
stark hypoton	1,33 ± 0,17	183,90 ± 54,78	3,06
schwach hypoton	0,53 ± 0,08*	70,67 ± 11,66	1,18
schwach hyperton	1,14 ± 0,19	187,30 ± 47,57	3,12
<i>Xylometazolinhydrochlorid</i>			
Referenz (isoton)	1,69 ± 0,18	117,78 ± 35,88	3,59
stark hypoton	1,97 ± 0,66	155,69 ± 36,93	4,74
schwach hypoton	0,93 ± 0,19	85,59 ± 27,65	2,61
schwach hyperton	1,52 ± 0,38	119,14 ± 69,04	3,63
<i>Oxymetazolinhydrochlorid</i>			
Referenz (isoton)	0,78 ± 0,11	88,12 ± 11,30	2,54
stark hypoton	1,06 ± 0,41	87,74 ± 59,86	2,53
schwach hypoton	0,94 ± 0,10	77,94 ± 25,30	2,24
schwach hyperton	0,89 ± 0,30	83,97 ± 47,78	2,42

* Signifikanz

Auf die Permeabilität der **Mukosa** erwies sich die Tonizität der Arzneistofflösungen in den geprüften Varianten als ein wenig Einfluss nehmender Parameter. Die schwach hypertonische Lösung nahm in keinem Fall Einfluss auf die Permeabilität. Hypotonische Lösungen übten dagegen einen Effekt auf das Permeationsverhalten der Arzneistoffe aus. Insbesondere führte die schwach hypotone Formulierung mit DSCG zur signifikanten Erniedrigung von P_{app} .

Eine mögliche Erklärung für diesen Befund sind die im biologischen Gewebe auftretenden Veränderungen im Zellvolumen. Die stark hypotonische Lösung verursacht anfangs eine Zunahme des Zellvolumens, um das osmotische Druckgefälle auszugleichen. Danach erfolgt eine gegenregulatorische Abnahme des Zellvolumens durch einen Ausstrom von Elektrolyten und Wasser („aktive Transportprozesse“) aus dem Zellinneren. Für die In-vitro-Permeationsanordnung kommt neben diesem Effekt ein Volumenstrom von der hypotonischen zur isotonischen Seite zustande, der als „solvent drag“ bekannt ist [155, 156]. Von diesem Flüssigkeitsstrom werden auch die Arzneistoffe erfasst. Salomon et al. [157] geben an, dass die initiale Tonizität auf diese osmotischen Volumenregulationsvorgänge Einfluss nimmt. So lässt die schwach hypotonische Lösung die epithelialen Zellen vermutlich nur anschwellen, ohne dass dabei im gleichen Maße ein Flüssigkeitsstrom vom Donator- zum Akzeptor-

kompartiment erfolgt und eine Regulation des Zellvolumens auftritt. Die Größe der „Poren“ der auf diese Weise gequollenen Membran nimmt möglicherweise ab. Das könnte einerseits erklären, warum die Rindernasenschleimhaut für das größere Molekül DSCG aus der schwach hypotonen Lösung signifikant weniger permeabel ($P_{\text{app Referenz}} > P_{\text{app schwach hypoton}}$) ist und für OXY dagegen die Permeabilität nicht beeinträchtigt wird. Andererseits könnte die behinderte Permeation der drei Arzneistoffe ($P_{\text{app stark hypoton}} > P_{\text{app schwach hypoton}}$) aus dem schwach hypotonen System, verglichen mit dem stark hypotonen System, ihre Ursache in den möglicherweise auftretenden, in Abhängigkeit von der initialen Tonizität des Donatormediums unterschiedlich stark ausgeprägten volumenregulatorischen Vorgängen der epithelialen Zellen haben. Diese Permeationsbehinderung erwies sich im Falle des größeren Moleküls DSCG wiederum als signifikant (t -Test).

Der Vergleich der Permeationsdaten von OXY und XYLO zeigt, dass neben der Molekülgröße der permeierenden Substanz auch die Lipophilie das Ausmaß des Tonizitätseffektes auf die biologische Membran zu beeinflussen scheint. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die osmotisch bedingten Veränderungen des Volumens der epithelialen Zellen auch auf transzelluläre Transportprozesse Einfluss nehmen. Auch eine Beeinflussung der Polarität der epithelialen Zellmembran und ihrer Oberflächeneigenschaften ist denkbar [62].

Das permeabilitätsmindernde Phänomen für DSCG aus dem stark hypotonen Cromoratiopharm® (Tab. 7) an beiden Membranen können diese Versuche jedoch nicht erklären. Die höhere Konzentration der Substanz in dem FAM scheint für diesen Effekt verantwortlich zu sein.

Der Formulierungsparameter Tonizität nahm auf das Permeationsverhalten der Arzneistoffe durch die *synthetische Membran* keinen signifikanten Einfluss (Daten in 7.4 dokumentiert). Alle Effekte, die durch Variation der Tonizität im Permeationsverhalten an der Rindernasenschleimhaut auftreten, sind somit durch eine Wechselwirkung mit der biologischen Membran bedingt.

D Einfluss des Isotonisierungsmittels

Nicht nur die Tonizität beeinflusst das Permeationsverhalten an biologischen Membranen, sondern auch die Art des verwendeten Isotonisierungsmittels [37]. Für verschiedene Isotonisierungsmittel sind in Abhängigkeit von der Tonizität zwar gleiche Effekte auf die Permeabilität von intestinalem Gewebe beschrieben worden, doch das Ausmaß der Effekte unterschied sich zwischen den einzelnen osmotisch wirksamen Zusätzen jedoch deutlich [158].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Permeationsstudien untersuchen den Einfluss der Isotonisierungsmittel **Sorbitol**, **Glukose** und **Natriumchlorid**, die einem hypotonen Phosphatpuffermedium (70 mOsmol/kg) zugeführt werden, auf die Permeabilität der Mukosa für die Modellarzneistoffe. In Tabelle 13 sind die ermittelten Daten der Permeationen durch Rindernasenschleimhaut wiedergegeben.

Tabelle 13: Einfluss des Isotonisierungsmittels auf die Permeation durch Rindernasenschleimhaut

Isotonisierungsmittel	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [µg]	Q_{60} [%]
<i>Natriumcromoglicat</i>			
Referenz¹	1,41 ± 0,23	185,09 ± 74,42	3,08
Sorbitol	0,81 ± 0,17*	115,09 ± 51,15	1,92
Glukose	0,80 ± 0,22*	140,23 ± 70,46	2,34
Natriumchlorid	0,72 ± 0,07*	113,87 ± 22,61	1,90
<i>Xylometazolinhydrochlorid</i>			
Referenz¹	1,69 ± 0,18	117,78 ± 35,88	3,59
Sorbitol	4,12 ± 0,91	306,44 ± 195,10	9,33
Glukose	1,19 ± 0,47	101,24 ± 79,48	3,08
Natriumchlorid	1,52 ± 0,65	118,91 ± 50,37	3,62
<i>Oxymetazolinhydrochlorid</i>			
Referenz¹	0,78 ± 0,11	88,12 ± 11,30	2,54
Sorbitol	1,43 ± 0,49	104,14 ± 50,31	2,99
Glukose	1,39 ± 0,24	103,59 ± 42,91	2,98
Natriumchlorid	2,19 ± 0,62	162,04 ± 79,23	4,66

¹ Die Referenz ist ebenfalls isotonisch mittels PBS.

* Signifikanz

Bei den Arzneistoffen OXY und XYLO nahm der Formulierungsparameter Isotonisierungsmittel auf deren permeierte Menge durch **Nephrophan[®]** keinen Einfluss (Daten in 7.4 dokumentiert). Bei DSCG hingegen verringerte die Isotonisierung mit jeder der Testsubstanzen den P_{app} signifikant (t -Test) gegenüber der Referenz (Daten unter ↑ 4.3.1.5 dargestellt). Für Natriumcromoglicat liegt also ein Einfluss des Isotonisierungsmittels als Formulierungsparameter vor, der folglich auch die Permeabilitätswerte der biologischen Membran determinieren wird. Dabei sind sowohl die Veränderung der Lösungseigenschaften des Wassers durch Hydrotropierungs- (Glukose, Sorbitol) [78] oder Aussalzeffekte (Natriumchlorid) [159] als auch Veränderungen im Dissoziationsverhalten der Substanz selbst in freie Ionen denkbar.

In der Tat dominierte für DSCG auch an der **biologischen Membran** (Tab. 13) der bei der Verwendung der synthetischen Barriere festgestellte Formulierungseinfluss. Alle drei Isotonisierungsmittel führten zur signifikanten Erniedrigung von P_{app} . Da die Effekte für OXY und XYLO in dieser Form nicht feststellbar waren, scheinen für DSCG substanzspezifische Komponenten das Permeationsverhalten zusätzlich zu beeinflussen.

Im Falle von OXY und XYLO führte die Isotonisierung des Phosphatpuffers durch die getesteten Isotonisierungsmittel zu einer eher erhöhten Permeabilität. Der Sorbitolzusatz zeigte für XYLO eine markante Erhöhung der permeierten Menge. Romejin et al. [160] stellten bei der Überprüfung des Einflusses von Formulierungsparametern auf die Zilientätigkeit in vitro fest, dass ein Zusatz von Sorbitol die bekannten negativen Effekte von BAC und XYLO deutlich verschlechterte. Als verantwortlich angesehen wird dafür die verbesserte Penetrationsfähigkeit der Substanzen in die Zilienzellen. Diese Überlegung ist auch für den hier beobachteten Effekt diskutabel und bestätigt gleichzeitig die Vermutung, dass für XYLO transzelluläre Transportprozesse eine Rolle spielen können.

Der für OXY als wahrscheinlich anzunehmende parazelluläre Transportweg dient hauptsächlich dem Transport von geladenen, hydrophilen Substanzen und ist damit ein Maß für die Ionenpermeabilität des Gewebes. Es ist denkbar, dass ionische Zusätze diesen Transportmechanismus stärker beeinflussen als den transzellulären. Dafür würde die gefundene gesteigerte Permeabilität durch Natriumchlorid sprechen (Tab. 13).

Ein Flüssigkeitsstrom durch ein osmotisches Druckgefälle ist bei dieser Versuchsanordnung auszuschließen, da in beiden Kompartimenten isoosmotische Lösungen verwendet wurden. Dennoch werden durch die Ungleichverteilung der enthaltenen Ionen Konzentrationsgradienten und damit gegebenenfalls ein dem der Transportrichtung der Arzneistoffmoleküle entgegengesetzter Diffusionsfluss induziert. Daneben können ionische Zusätze, z. B. Natriumchlorid, den Ladungszustand der biologischen Membran verändern [161]. Auch die geladenen Arzneistoffe selbst können in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Puffers (siehe Tab. 23) möglicherweise auf die Oberflächen- und Dipoleigenschaften von Mukosa und epithelialen Membranen Einfluss nehmen [162].

Eine einheitliche Aussage für alle drei Arzneistoffe hinsichtlich des Isotonisierungsmiteleinflusses gestaltet sich als schwierig. Deutlich gezeigt werden konnte jedoch, dass isotonisierende Zusätze über Wechselwirkungen mit der biologischen Membran und/oder den verwendeten Arzneistoffen und nicht zuletzt über Wasserstrukturphänomene das Permeationsverhalten beeinflussen können.

E **Resümee der Permeationsstudien**

Die durchgeführten Permeationsstudien verdeutlichen für DSCG ein von XYLO und OXY abweichendes Permeationsverhalten. Die vergleichende Betrachtung der P_{app} von DSCG, XYLO und OXY nach Permeation durch Rindermukosa und Nephrophan[®] lässt für die meisten der untersuchten Formulierungsparameter keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen erfasstem Permeationsverhalten, molekularer Struktur und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der drei Arzneistoffe erkennen.

Dagegen zeigt die vergleichende Betrachtung der Permeationsdaten der Strukturanaloga **OXY** und **XYLO** den erwarteten Zusammenhang zwischen Permeationsverhalten an der biologischen Membran und ihrer unterschiedlichen Lipophilie sowie Molekülgröße. So verhalten sich sowohl die V/K der beiden Arzneistoffe als auch die P_{app} nach Permeation mit ihrer Referenzlösung wie 1:2,2. Die Formulierungsparameter Tonizität, Isotonisierungsmittel, EDTA und BAC beeinflussen, in Abhängigkeit von den durch die Lipophilie bedingten Transporteigenschaften der Substanzen, dementsprechend die Permeabilität der Rindernasenschleimhaut mehr oder weniger ausgeprägt. So ist z. B. im Falle von XYLO, das die Voraussetzung zu transzellulärem Transport aufweist, die Wirkung des parazellulären Enhancers EDTA vergleichsweise gering.

Die In-vitro-Verfügbarkeit (Mukosa) von **OXY** und **XYLO** aus den FAM lässt sich durch die Summation der Einzeleffekte erklären. Die Vielzahl der sich überlagernden Einzeleffekte gestattet allerdings Verallgemeinerungen hinsichtlich der Einfluss nehmenden Formulierungsparameter nur in begrenztem Umfang. So führt z. B. die Kombination von EDTA mit Sorbitol (Xylo comod[®]) zu einer erhöhten Permeabilität der biologischen Membran für XYLO ($P_{app \text{ Xylo comod}} > P_{app \text{ Referenz}}$) und bestätigt somit die aufgetretenen Einzeleffekte. Die Kombination der Konservierungsmittel BAC und EDTA in den FAM Nasentropfen E ratiopharm[®], Nasan[®] und Xylo von ct[®] hingegen nivelliert die Enhancerwirkung von EDTA. ($P_{app \text{ Xylo comod}} > P_{app \text{ Nasan}} = P_{app \text{ Nasentropfen E ratiopharm}} = P_{app \text{ Nasan}}$).

Aus den Nephrophan[®]-Permeationsversuchen mit OXY und XYLO ($P_{app \text{ OXY/XYLO}}$ für alle untersuchten Formulierungen ohne signifikanten Unterschied (ANOVA)), Daten dokumentiert in 7.4), bei denen eine direkte Membranbeeinflussung durch die Komponenten der Formulierung ausgeschlossen werden kann, ist abzuleiten, dass die Formulierungsparameter sehr wohl auf die biologische Membran einen Effekt ausüben, der entsprechend der Lipophilie und Molekülgröße der Arzneistoffe deren Permeationsverhalten verändert.

Im Falle von **DSCG** nehmen die Formulierungsparameter sowohl auf die Permeation der Substanz durch die biologische Membran als auch durch Nephrophan[®] Einfluss. Für die

getesteten Isotonisierungsmittel war an beiden Membranen der gleiche, statistisch signifikante (verglichen mit der Referenz) permeationsmindernde Effekt feststellbar. Der Zusatz der Isotonisierungsmittel zu DSCG-Lösungen zeigte damit einen Formulierungseinfluss auf DSCG selbst. Die Formulierungsparameter EDTA, BAC und Tonizität übten lediglich an der Rindermukosa Effekte auf das Permeationsverhalten von DSCG aus, die jedoch z. B. durch die Bildung des Ionenpaares mit BAC oder die selbstenhancenden Fähigkeiten von DSCG stark wirksubstanzspezifisch sind.

Verallgemeinerungen zu den erfassten einflussnehmenden Formulierungsparametern (**Eigenrezepturen**) auf das Permeationsverhalten von DSCG anhand der P_{app} , die aus den DSCG-FAM resultierten, gestalten sich durch die Vielzahl und Komplexität der möglichen Effekte als schwierig. Das hat nicht zuletzt auch seine Ursache darin, dass DSCG konzentrationsabhängige Effekte im Permeationsverhalten sowohl an der biologischen ($P_{app} \text{ FAM (20 mg/ml)} < P_{app} \text{ Eigenrezepturen (2 mg/ml)}$) als auch an der synthetischen Membran ($P_{app} 20 \text{ mg/ml} < P_{app} 2 \text{ mg/ml}$, siehe ↑ 4.3.3.1, Tab. 16 und 17) zeigt und die Konzentration von DSCG in den FAM 20 mg/ml in den Eigenrezepturen hingegen nur 2 mg/ml beträgt.

4.2.2.2 Mucinwechselwirkungsstudien

Der Einfluss der in den Permeationsstudien untersuchten Formulierungsparameter Isotonisierungsmittel, Tonizität, EDTA und BAC wurde auch in Hinblick auf eine Wechselwirkung mit dem nasalen Mukus untersucht. Dabei wurde überprüft, ob der Zusatz der verwendeten Hilfsstoffe und/oder Puffersysteme verschiedener Tonizität selbst, also der arzneistofffreien Formulierungen, die rheologischen Parameter der Mucinmodelldispersion verändert oder auf eine mögliche Wechselwirkung der Arzneistoffe mit den Mucinglykoproteinen Einfluss nimmt.

Die Mucinwechselwirkungsstudien zum Einfluss der Formulierungsparameter wurden unter Verwendung einer oszillationsrheologischen Methode durchgeführt (↑ 5.2.5.1). In Analogie zur Viskositätsbestimmung bei der Ermittlung des Mukoadhäsionsindex (↓ 4.2.1.3) wurden die bei einer mittleren Kreisfrequenz ($\omega = 16,9 \text{ 1/s}$) dem Frequenzsweep des Oszillationsversuches entnommenen oszillationsrheologischen Größen **Speichermodul** G' , **Verlustmodul** G'' und **Komplexe Viskosität** $|\eta^*|$ der Mucindisperion vor und nach dem Zusatz der zu untersuchenden Formulierungen verglichen. Dabei stellt die Komplexe Viskosität eine zusammengesetzte Größe aus den elastischen (G') und viskosen (G'') Eigenschaften der Messproben dar. Darüber hinaus wurde auch der Frequenzabhängigkeit der oszillationsrheologischen Größen Rechnung getragen. Beispielfhaft wurden der graphischen Darstellung „ $\log G'$ gegen $\log \omega$ (Kreisfrequenz)“, die die belastungsabhängige Elastizität der Messprobe beschreibt, die Steigungen (m) der resultierenden Geraden und ihr Schnittpunkt mit der y-Achse (y_A) entnommen.

Als Kriterium für einen vorliegenden Formulierungseinfluss auf die rheologischen Parameter der Mucindispersion wurde die Lage der ermittelten Werte der arzneistofffreien und arzneistoffhaltigen Mucin/Formulierungs-Gemische außerhalb der 95 % Konfidenzintervalle der Werte der Mucindispersion (M) bzw. Mucin/Arzneistoff-Mischungen betrachtet, die in Tabelle 14 angegeben sind.

Tabelle 14: 95 % Konfidenzintervalle der oszillationsrheologischen Größen des Mucins bzw. der Mucin/Arzneistoff-Mischungen

	G' [Pa]	G'' [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]	m [Pa/s]	yA [Pa]
Mucindispersion					
M	3,71 ... 4,01	8,82 ... 9,02	0,56 ... 0,60	1,412 ... 1,466	1,351 ... 1,270
Mucin/Arzneistoff-Mischungen					
M/DSCG	5,84 ... 7,32	10,46 ... 12,64	0,72 ... 0,88	1,059 ... 1,188	0,542 ... 0,765
M/OXY	3,86 ... 4,18	8,51 ... 9,01	0,57 ... 0,59	1,413 ... 1,462	1,271 ... 1,349
M/XYLO	3,75 ... 3,95	8,63 ... 9,13	0,57 ... 0,61	1,423 ... 1,469	1,269 ... 1,347

M Mucindispersion

Von den ermittelten rheologischen Größen der untersuchten Formulierungen (wirkstofffreie Eigenrezepturen, s. Abschnitt 4.2.2) im Gemisch mit Mucin bzw. der Mucin/Arzneistoff-Kombination lag keine außerhalb des jeweiligen berechneten Konfidenzintervalls. Batts et al. [138] konnten bei Zusatz von BAC und EDTA zu einer Mucindispersion auch keine Veränderung der rheologischen Parameter im Oszillationsversuch finden. Oechsner et al. [89] ermittelten dagegen für BAC konzentrationsabhängig (0,1 mg/ml) mittels einer rotationsrheologischen Viskositätsbestimmung sogar negative Mukoadhäsionsindizes ($M-I_x = -0,83$ Pa).

Die Eigenrezepturen (Referenz) der alpha-Sympathomimetika OXY und XYLO zeigten, wie schon ihre Fertigpräparate (4.2.1.3), keinen Effekt auf die erfassten oszillationsrheologischen Parameter der Mucindispersion. Selbst Versuche von OXY mit einer DSCG äquimolaren Konzentration in PBS führten zu keiner messbaren Veränderung (↑ 4.3.3.5).

Der „adhäsive“ Effekt von DSCG auf die oszillationsrheologischen Charakteristika der Mucindispersion (Tab. 14) wurde von keinem der getesteten Formulierungsparameter statistisch signifikant beeinflusst (ANOVA).

4.2.2.3 Vitalität und Integrität der Mukosa

Nach erfolgten Permeationen wurden Kontrolluntersuchungen zur Integrität und Vitalität der biologischen Membran durchgeführt.

A Lactatdehydrogenase- und Proteinbestimmungen

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die verwendeten Arzneistoffe, zugesetzte Hilfsstoffe und/oder verwendete Puffersysteme auf die Membran einen schädigenden Einfluss ausüben, wurde, wie wiederholt in der Literatur beschrieben [56, 163, 164], versucht, die Laktatdehydrogenase (LHD) als intrazelluläres Enzym und damit als direkten Marker für Membranschädigungen in den Donator- und Akzeptormedien der Permeationsversuche zu bestimmen. Darüber hinaus erfolgte als unspezifisches Verträglichkeitsmaß die Erfassung der Gesamtproteine in den Kompartimenten nach der Permeation. Im Gegensatz zu histologischen Untersuchungen kann ein schädigender Einfluss auf diese Weise quantitativ und ggf. einfacher ermittelt werden [165].

Die Bestimmung der LDH war in allen DSCG-haltigen Systemen nicht möglich, da die Wellenlänge, bei der das farbige Reaktionsprodukt unter Verwendung eines Testkits absorbiert, im Bereich der Absorptionswellenlänge von DSCG ($\lambda = 326 \text{ nm}$) liegt. Eine Verdünnung war infolge der geringen Menge an LDH (Literaturwerte [163]) nicht durchführbar. Die Bestimmung zeigte sich zudem in starkem Maße vom verwendeten Puffersystem und/oder Hilfsstoffzusatz abhängig.

Die im Verlauf einer Permeation aus der Membran freigesetzten Mengen an Protein lassen sich zur einfachen Feststellung einer unspezifischen Membranschädigung heranziehen, denn sie können intrazelluläre Proteine und Membranproteine, aber auch Glykoproteine des nasalen Mukus [56, 166] erfassen. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Donatoren und Akzeptoren der Permeationsversuche (↑ 5.2.7) erfolgte nach der Bestimmungsmethode von Lowry [167], die auf einer Reaktion von Phosphormolybdänwolframsäure (Folin-Ciocalteu-Reagenz) und Kupfer(II)-Salzen (Lowry-Reagenz) mit den funktionellen Gruppen von Aminosäuren beruht. Die Lowry-Reaktion stellt zwar eine äußerst empfindliche Methode der Proteinbestimmung dar, weist aber nur geringe Selektivität auf. Eine Kalibrierung für jedes Puffersystem und jeden Hilfsstoff-/Arzneistoffzusatz ist daher erforderlich [168].

Die Ultrazentrifugation (↑ 5.2.7) zum „Entsalzen“ der Donatoren und Akzeptoren ist eine Möglichkeit, um den Einfluss störender Substanzen auf die Bestimmung auszuschalten. Dieser analytische Aufwand erschien jedoch weder im Falle der routinemäßigen Bestimmung der LDH noch bei der Erfassung der Gesamtproteine im Rahmen der Permeationsstudien als

gerechtfertigt, wurde aber beispielhaft für die Bestimmung der Proteingehalte in den Inkubationsflüssigkeiten und Permeationskompartimenten im Rahmen der Versuche der In-vitro-Penetration von DSCG in Rindernasenschleimhaut (↑ 4.3.2) unternommen.

Vorversuche zu den Proteinbestimmungen im Rahmen der Permeationsstudien mit DSCG ergaben folgende Ergebnisse:

- Der Proteingehalt der unbehandelten Membran beträgt $(48,03 \pm 4,43) \%$. Nach einer Permeation (EBS, arzneistofffrei) liegt der Proteingehalt bei $(41,52 \pm 5,24) \%$.
- Das durchschnittliche Trockengewicht der Membran über der Diffusionsfläche liegt bei 2 mg, d. h., dass während einer Permeation maximal ca. 330 µg Gesamtproteine (entspricht einer Abnahme des Proteingehaltes um ca. 6,5 %, siehe oben) freigesetzt werden können, ohne dass ein schädigender Einfluss vorliegt. Für jedes Kompartiment (3 ml Volumen) resultieren also folglich maximal 150 µg bzw. 50 µg/ml. Die Bestimmungsgrenze dieser Methode liegt bei 30 µg/ml.
- Am Ende einer arzneistofffreien Permeation mit EBS ohne Austausch der Vorinkubationslösung lagen im Akzeptor 106,62 µg und im Donator 166,35 µg Gesamtproteine vor. Diese Menge entspricht bei einem ermittelten Wassergehalt der Membran von ca. 85-90 % und dem hypothetischen Proteinverlust von 6,5 % ungefähr dem theoretischen Wert von 200 µg. Bei dem gleichen Versuch mit Austausch der Vorinkubationsflüssigkeiten konnte im Akzeptor keine Proteinmenge quantifiziert werden, im Donator betrug die Menge Gesamtprotein ca. 10 µg.
- Die Bestimmung der Proteingehalte der Membranen nach den Permeationen der verwendeten hypotonischen Lösungen ließ zwar eine tendenziell größere Abnahme des Proteingehaltes der Membran erkennen, jedoch lassen die Fehlergrenzen keine statistisch gesicherte Aussage zu.
- In den Akzeptoren der Permeationsstudien zur Erfassung der In-vitro-Penetration von DSCG in Rindernasenschleimhaut konnte nach einer Ultrazentrifugation für kein System (arzneistofffrei, arzneistoffhaltig) eine quantifizierbare Menge Protein gefunden werden. Die Proteinmengen in den Donatoren lagen alle unterhalb der Bestimmungsgrenze. Tendenziell zeigten alle natriumcromoglicathaltigen Systeme eine leicht erhöhte Proteinfreisetzung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für keines der verwendeten arzneistofffreien Systeme eine markante Erhöhung der freigesetzten Proteine, verglichen mit EBS als Positivkontrolle, gefunden wurde. Der größte Teil des Proteinverlustes ereignete sich während der Vorinkubation. Anzunehmen ist, dass akzeptorseitig Bindegewebsreste und donatorseitig ein großer Teil der Mukusschicht extrahiert wurden.

B *Leitfähigkeitsmessungen*

Als weitere Methode zur Erfassung der Integrität der Rindernasenschleimhaut im Zusammenhang mit den Permeationsstudien wurden Leitfähigkeitsmessungen herangezogen.

Beim Anlegen einer Wechselspannung hoher Frequenz an platinierter Platinelektroden, die sich in einem Elektrolyten befinden, resultiert durch den Transport der enthaltenen Ladungsträger ein Stromfluss. Die spezifische Leitfähigkeit, als Kehrwert des spezifischen Widerstandes eines solchen Systems, ist durch Konzentration, Wertigkeit und Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen (Ladungsträger) eindeutig festgelegt. Die den Leitfähigkeitsmessungen zugrunde liegende Gesetzmäßigkeit, das Ohmsche Gesetz, erfordert, dass Vorgänge an den Elektroden, also Polarisationserscheinungen, Feldstärkeeffekte und frequenzabhängige Effekte unterdrückt werden. Das wird durch die Verwendung einer hochfrequenten Wechselspannung und platinierter Elektroden erreicht [169].

Sind die beiden Elektroden einer solchen Leitfähigkeitsmesszelle durch eine biologische Membran getrennt, kann der Strom theoretisch auf zweierlei Weise über die trennende Membran fließen:

- Umfließen der epithelialen Zellen
- Durchfließen der epithelialen Zellen [170]

Da biologische Zellmembranen durch ihren strukturellen Aufbau als ausgezeichnete Isolatoren [171] fungieren, werden sie kapazitiv überbrückt. Der Strom fließt zwischen den Zellen, d. h. durch den Interzellularraum. Der messbare transepitheliale Widerstand eines solchen Systems resultiert aus dem Widerstand des Elektrolyten und dem parazellulären Widerstand, der sich aus dem Widerstand des Interzellularraumes und dem der Tight-junctions zusammensetzt. Da der Widerstand des Interzellularraumes lediglich einen marginalen Anteil am parazellulären Widerstand hat, ist letzterer Ausdruck für den Widerstand der Tight-junctions, resultierend aus ihrer Anzahl und ihrem Öffnungszustand im Sinne der Querschnittsfläche des elektrolytischen Leiters [50]. Der auf diese Weise ermittelte TEER-Wert ist ein Maß für die Ionenpermeabilität. Er ist somit ein hilfreiches Mittel zum Untersuchen der funktionellen Integrität einer biologischen Membran und deren Permeabilität für hydrophile, ionische Verbindungen, also parazelluläre Transportprozesse. Die unter 3.3.2 beschriebene Messanordnung zur Erfassung des TEER-Wertes bezieht sich letztlich auch auf die Erfassung der für den Stromfluss zur Verfügung stehenden Querschnittsfläche, jedoch werden aktive Iontentransportprozesse des Gewebes miterfasst.

Für Monolayer intestinaler Zellkulturen sind klare Zusammenhänge zwischen Integrität, Permeabilität und TEER ermittelt worden [148, 149]. Für das Modell Rindernasenschleimhaut erweist sich diese Versuchsanordnung als grundsätzlich schwierig, da dieses

„leaky“ Epithel lediglich TEER-Werte von ca. $40 \Omega \text{ cm}^2$ aufweist [42]. Bei der verwendeten Apparatur mit einer Membranfläche von ca. $0,6 \text{ cm}^2$ bedeutet das noch mal eine Reduktion um 40 %. Schmidt et al. [67] fanden, dass bei Rindermukosa, im Falle von Mannitol als Marker für parazelluläre Transportmechanismen, kein Zusammenhang zwischen TEER und erhöhter Permeabilität bestand. Wikman-Larhed et al. [53] und Borchardt et al. [52] bestätigen, dass der Transport parazellulärer Markersubstanzen sogar im Falle intestinaler Zellkulturen ein deutlich sensibleres Permeabilitätsmaß als der TEER-Wert darstellt, obwohl z. B. für die intestinale Zelllinie Caco-2 transepitheliale Widerstände von über $600 \Omega \text{ cm}^2$ charakteristisch sind.

Die Ergebnisse der nach 5.2.1.6 durchgeführten Leitfähigkeitsmessungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Equilibrierungsphase (30 min)

- Für Nephrophan[®] ergaben die Leitfähigkeitsmessungen keinen Unterschied zum membranfreien Permeationssystem, wenn beide Kompartimente mit EBS befüllt wurden. Innerhalb der Vorinkubationszeit konnte keine Veränderung der Leitfähigkeit festgestellt werden.
- Bei der Verwendung der Rindernasenschleimhaut unterschieden sich die Ausgangsleitfähigkeiten für die individuellen Membranen deutlich. Eine Veränderung der Leitfähigkeit während der Equilibrierungsphase war festzustellen. Somit ergab sich ein Unterschied zur synthetischen Membran.

Hauptpermeationsversuch (60 min)

- Eine Korrelierbarkeit von veränderter Membranpermeabilität mit der erfassten Leitfähigkeit war nicht gegeben.
- Einflüsse der Hilfsstoffe BAC und EDTA auf die Leitfähigkeitswerte sowie Unterschiede für die drei Arzneistoffe konnten nicht festgestellt werden.
- Bei den Permeationen aus hypertonen, hypotonen und mit Sorbitol, Glukose bzw. Natriumchlorid isotonisierten Lösungen konnten folgende, für alle drei Arzneistoffe in gleicher Art und Weise auftretenden Effekte beobachtet werden (Abb. 17): Neben der Arzneistoffdiffusion erfolgt durch beide Membranen eine Diffusion der in den Puffern enthaltenen Ionen und/oder der Wassermoleküle, was durch Änderung der Leitfähigkeitswerte erfassbar ist. Dabei ergibt Natriumchlorid eine geringfügige Erhöhung der Messwerte, während die Isotonisierung mit Glukose und Sorbitol die Leitfähigkeit drastisch mindert. Die in den Puffern enthaltenen Ionen diffundieren durch die künstliche Membran erheblich schneller, was z. B. in der stärkeren Zunahme der Leitfähigkeit – verglichen mit der Leitfähigkeitszunahme an Rindermukosa – über die Versuchsdauer von 60 min bei Verwendung der Isotonisierungsmittel Sorbitol und Glukose seinen Ausdruck findet (Abb. 17 A).

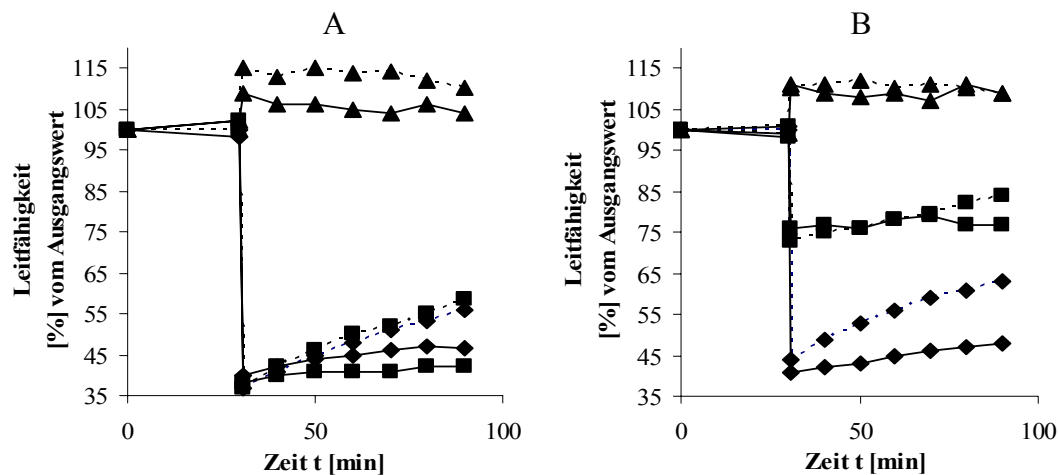


Abbildung 17: Veränderung der Leitfähigkeit über die Versuchsdauer mit Nephrophan® (----) oder Rindernasenschleimhaut (—) als Membran
 A: PBS 70 mOsmol/kg, isotonisiert mit: (◆) Sorbitol, (■) Glukose, (▲) Natriumchlorid
 B: PBS (◆) 70, (■) 170, (▲) 350 (mOsmol/kg)

Abschließend ist zu konstatieren, dass selbst eine Ja/Nein-Aussage hinsichtlich Vitalität, Integrität und Verträglichkeit der verwendeten Lösungen gegenüber der Membran aus den Versuchsdaten nur schwer möglich ist. Das verdeutlichen die prinzipiell für die Nephrophan®-Membran und Rindermukosa gleichen Leitfähigkeitsänderungen. Die bei der verwendeten Messanordnung erfasste Leitfähigkeit über die Membran konnte nicht um die Leitfähigkeit des Elektrolyten korrigiert werden, da donator- und akzeptorseitig verschiedenartige Medien verwendet wurden. Der Hauptanteil der gemessenen Leitfähigkeit resultierte folglich aus der Leitfähigkeit des Elektrolyten. Weiterhin hatte die Drehbarkeit der Diffusionszellen (s. Abb. 5), die zu unterschiedlicher Positionierung der Elektroden führte, einen nachteiligen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit und damit Vergleichbarkeit der Werte. Aus einer hypothetischen Abnahme des TEER-Wertes um 50 % würde eine Widerstandsabnahme von ca. 8Ω resultieren. Zur Erfassung dieser Veränderung besaß jedoch die verwendete Messanordnung eine nichtausreichende Empfindlichkeit.

Die aufgetretene Veränderung der Leitfähigkeitswerte während der Vorinkubation bei der Verwendung von Rindernasenschleimhaut als Membran sprechen für vorhandene Vitalität. Durch Öffnungs- und Schließungsvorgänge der TJ im vitalen Gewebe verändert sich die Querschnittsfläche des Leiters im Sinne des Widerstandes für die Ionenbeweglichkeit und damit die Leitfähigkeit des gesamten Systems.

Gezeigt werden konnte durch die Leitfähigkeitsuntersuchungen in der Equilibrierungsphase, dass Nephrophan® die Diffusion der in den Puffersystemen enthaltenen Ionen nicht einschränkt. Der Strom kann ungehindert durch die Membran fließen. Zugleich kann daraus geschlussfolgert werden, dass sich der Quellungszustand der vorgequollen verwendeten

Membran nicht ändert. Quellungsversuche, deren Ergebnisse in Tabelle 15 dargestellt sind, bestätigen diese Schlussfolgerung.

Tabelle 15: Quellungsverhalten von Nephrophan[®] und Rindermukosa (Angabe in % (m/m) vom Trockengewicht)

Vorinkub.	EBS	PBS	PBS/70	PBS/350	Wasser
Nephrophan[®]					
keine	n.b.	77,96 ± 17,41	78,39 ± 14,11	77,99 ± 15,75	78,57 ± 14,36
Rindernasenschleimhaut					
keine	88,49 ± 25,70	86,54 ± 28,31*	84,99 ± 35,21*	86,73 ± 30,40	n.b.
EBS	92,98 ± 19,33	91,52 ± 23,04*	90,18 ± 23,99*	91,62 ± 14,13*	n.b.
Triton [®]	91,32 ± 28,45	90,65 ± 20,52	89,82 ± 28,53	90,56 ± 18,51	n.b.

* signifikant vom EBS-Wert (*t*-Test),

n. b. nicht bestimmt

Vorinkub. Vorinkubation (Triton[®]: 1 % (m/V) in EBS)

Das Quellungsverhalten der Rindermukosa in den untersuchten Pufferlösungen verschiedener Zusammensetzung oder Tonizität, ggf. nach Vorinkubation mit der als nachgewiesen membranschädigenden Substanz Triton[®] [136], spiegelt die in vitalem biologischem Gewebe auftretenden regulatorischen Veränderungen des Zellvolumens in nichtisotonischen Medien, die bereits unter 4.2.2 beschrieben wurden, wider. Dieses Ergebnis unterstützt daher zugleich die Behauptung einer vorhandenen Vitalität des verwendeten exzidierten Gewebes, denn nach Vorinkubation des Gewebes mit Triton[®] treten die volumenregulatorischen Vorgänge nicht auf (siehe Tab. 15). Gleichzeitig kann das ermittelte Quellungsverhalten der Rindermukosa die geringere Zunahme der Leitfähigkeit bzw. die kleineren P_{app} der Permeationsstudien mit dem schwach hypotonen System, verglichen mit dem stark hypotonen Phosphatpuffer, erklären. Das schwach hypotone System lässt die epithelialen Zellen nur anschwellen (Masse der inkubierten Membran nimmt zu); die Ionenbeweglichkeit durch die Membran (Leitfähigkeitszunahme über die Versuchsdauer, Permeabilität für die Arzneistoffe) nimmt ab. Das stark hypotone System bewirkt dagegen durch die gegenregulatorische Volumenveränderung weder eine signifikante Massenzunahme noch markante Permeabilitätsveränderung der Membran.

Da bei den mit Glukose, Sorbitol und Natriumchlorid isotonisierten Systemen im Falle von Nephrophan[®] eine Quellung der Membran und ein osmotisch bedingter Flüssigkeitsstrom auszuschließen sind, kann die Zu- oder Abnahme der Leitfähigkeit (Abb. 17 A) nur durch eine Verschiebung von Ladungsträgern in beiden Kompartimenten zustande kommen. Versuche mit Leitfähigkeitsmessungen in den jeweiligen Einzelkompartimenten, d. h.

nicht über die Membran, zeigten z. B. im EBS-haltigen System eine Leitfähigkeitsabnahme über die Versuchsdauer von 60 min, im sorbitolhaltigen Kompartiment dagegen eine Zunahme (Daten nicht dargestellt). Diese Veränderung der Leitfähigkeit folgte jeweils keinem linearen Zusammenhang; sie ergibt sich aus der „Wanderungsgeschwindigkeit“ aller Ionen.

4.3 Spezielle Untersuchungen mit Natriumcromoglicat

Die vorausgehenden Untersuchungen ließen für Natriumcromoglicat eine Vielzahl von Variablen mit Einfluss auf das Permeationsverhalten erkennen. Da OXY und XYLO infolge der geringen zu erwartenden systemischen Verfügbarkeit nach nasaler Applikation und damit dem weitgehenden Ausschluss einer Einflussnahme durch Formulierungsparameter bei gleichzeitiger Gefahr schwerwiegender resorptiver Nebenwirkungen nach Verschlucken (↑ 3.4.1.2) nicht in die In-vivo-Untersuchungen dieser Arbeit einbezogen wurden, wurde auch das Schwergewicht weiterführender In-vitro-Studien auf DSCG gelegt.

Die Ausführungen unter 4.2.2 haben verdeutlicht, dass DSCG zum einen ein konzentrationsabhängiges Permeationsverhalten aufweist und zum anderen Wechselwirkungen mit den verwendeten Vehikeln und/oder Hilfsstoffen verursacht. Untersuchungen verschiedener physikalisch-chemischer Parameter, vertiefende Permeations-/Penetrationsstudien sowie rheologische Untersuchungen sollen im Folgenden dieses Verhalten bzw. die Wechselwirkungen näher charakterisieren.

4.3.1 In-vitro-Permeation

4.3.1.1 Einfluss der Natriumcromoglicatkonzentration

A Physikalisch-chemische Untersuchungen

Starke Elektrolyte liegen in wässrigen Lösungen zumeist vollständig ionisiert vor. Dennoch wird beobachtet, dass konzentrationsabhängige Eigenschaften, wie z. B. die Gefrierpunktserniedrigung, mit steigender Konzentration nicht im erwarteten Maße zunehmen. Mit Konzentrationszunahme treten nämlich, durch die „Atmosphäre“ aus entgegengesetzt geladenen Ionen, vermehrt elektrostatische Anziehungskräfte und Ionenassoziationen auf. So kann ein starker Elektrolyt vollkommen ionisiert, aber trotzdem unvollkommen in freie Ionen dissoziiert sein. Man kann also sagen, dass eine Lösung eine „effektive Konzentration“ oder eine Aktivität hat [134].

Für Natriumcromoglicat ist mit steigender Konzentration (2 bis 50 mg/ml, Daten in 7.3 dokumentiert) zu konstatieren, dass

- die **Gefrierpunktserniedrigungen** und die **Leitfähigkeiten** der Lösungen nicht in dem Maße steigen wie deren Konzentration,
- die **dynamische Viskosität** der Lösungen mit steigender Konzentration überproportional zunimmt und
- die Viskositätszunahme und Leitfähigkeitszunahme eine unverhältnismäßige Temperaturabhängigkeit zeigen.

Die **Leitfähigkeit** der wässrigen Lösungen von DSCG zeigt mit Zunahme der Arzneistoffkonzentration ein deutlich abweichendes Verhalten von dem eines starken Elektrolyten (Quadratwurzelgesetz nach Kohlrausch [78]). Diese „**konstitutive physikalische Eigenschaft**“ wird also in ausgeprägtem Maße durch die kolligativen Eigenschaften, diejenigen, die von der Anzahl der Moleküle in der Lösung abhängen, überlagert.

Die **Gefrierpunktserniedrigung**, als kolligative und damit konzentrationsabhängige Eigenschaft, zeigt eine unverhältnismäßige Konzentrationsabhängigkeit für DSCG.

Oberhalb einer Konzentration von 10 mg/ml DSCG sind sowohl für die Leitfähigkeit als auch für die dynamische Viskosität und Gefrierpunktserniedrigung der Lösungen deutliche Veränderungen zu erkennen. Diese Veränderungen treten besonders deutlich bei Verwendung von PBS als Lösungsmittel hervor. Besonders markant ist der sprunghafte Anstieg der dynamischen Viskosität der gepufferten Lösungen bei Konzentrationen > 10 mg/ml DSCG (Abb.18).

Die **Oberflächenspannung** der wässrigen und gepufferten DSCG-Lösungen wird im Vergleich zum Wasser nicht erniedrigt. **Der pH-Wert** der Lösungen liegt konstant zwischen 6,2 und 6,5.

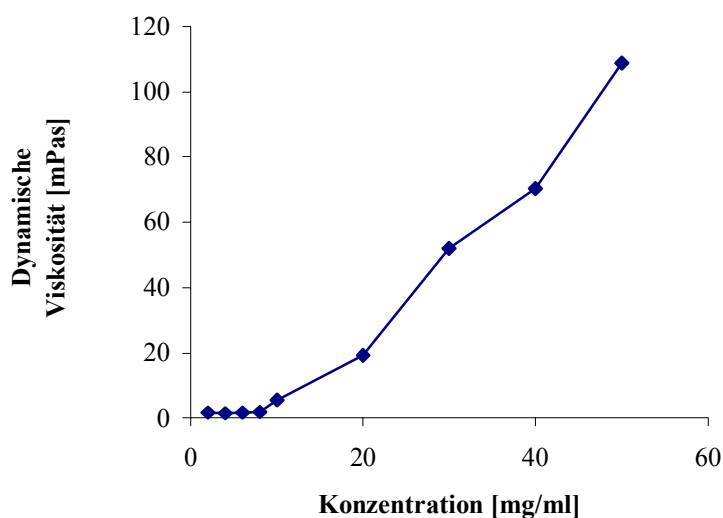


Abbildung 18: Dynamische Viskosität [mPas] von DSCG steigender Konzentration in PBS

Die sprunghafte Änderung physikalischer Eigenschaften der Lösung eines Stoffes mit Erhöhung seiner Konzentration deutet auf eine Assoziation der gelösten Moleküle hin: eine kolloidale Lösung entsteht [134]. Kolloidale Lösungen durch Molekülassoziationen zeigen eine Vielzahl charakteristischer und nichtlinear zusammenhängender physikalischer Eigenschaften [172].

Für DSCG-Lösungen mit einer Konzentration über 10 mg/ml kann ein „kolloidaler“¹ Lösungszustand angenommen werden. Insbesondere der überproportionale Anstieg der Viskosität dient als eindeutiges Indiz für die Entstehung von Molekülassoziaten [159]. Auch die zu beobachtende ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Viskosität (20 °C verglichen mit < 10 °C), die durch Zunahme von Wasserstoffbrückenbindungen mit abnehmender Temperatur bedingt ist [159], das Auftreten eines Klärungspunktes [173] sowie die Opaleszenz der DSCG-Lösungen (> 10 mg/ml) [174] deuten darauf hin. Durch Zusatz von Natriumchlorid kann bei Temperaturen < 10 °C eine Koagulation der Assoziate, ein „Aussalzeffekt“, beobachtet werden. Die solvatisierten Kolloide lagern sich infolge von Entladungsvorgängen, unter Verlust ihrer Solvathülle, zusammen [159]. Dieser Vorgang ist beim Erwärmen reversibel. Alle diese für DSCG in Abhängigkeit von der Konzentration beobachteten physikochemischen Phänomene lassen auf Selbstassoziationen schließen.

Jedoch ist aufgrund der fehlenden Oberflächenaktivität der DSCG-Lösungen nicht von klassischen „Assoziationskolloiden“, die durch Konzentrationserhöhung gelöster, amphiphiler Substanzen entstehen, auszugehen. So konnte auch mit Eosin-Natrium, einem Farbstoff der sich in mizellare Strukturen einlagert, keine Veränderung in Intensität und Wellenlänge des Absorptionsmaximums dieses Farbstoffs registriert werden (Daten nicht dargestellt). Desweiteren beeinflussen Elektrolytzusätze und Temperaturveränderungen den Konzentrationsbereich der für Assoziationskolloide charakteristischen „Kritischen Mizellbildungskonzentration“ (CMC) im Falle von DSCG (ca. 10 mg/ml) nicht (Abb. 19); auf die CMC klassischer Assoziationskolloide nehmen sowohl Temperatur als auch zugesetzte Elektrolyte Einfluss [134].

Das gefundene idealviskose Fließverhalten einer Lösung von DSCG (50 mg/ml) in PBS über einen Schergeschwindigkeitsbereich von 10 bis 100 1/s, das für einen hohen Ordnungsgrad und starke intermolekulare Wechselwirkungen (Daten in Anhang 7.3 dokumentiert) spricht sowie die von Champion et al. [175] beschriebene Bildung lyotroper flüssig-kristalliner

¹ **Disperse Systeme**, bestehend aus einer dispersen Komponente und einem Dispersionsmedium, werden nach der Größe (durchschnittlicher Teilchendurchmesser) des dispergierten Materials in **molekular-**, **kolloid-** und **grobdisperse** Systeme unterschieden, wobei die Klassengrenzen zum Teil willkürlich festgesetzt sind. Die kolloiden Systeme, die im Sinne der klassischen Phasenlehre weder als homogen noch heterogen anzusehen sind (Übergangssystem), lassen sich nach der Art der Wechselwirkung in **Molekül-**, **Assoziations-** und **Dispersionskolloide** unterteilen.

Die Zuordnung der DSCG-Lösungen (> 10 mg/ml) zu den „kolloidalen“ Systemen erfolgte anhand der für kolloidale Systeme charakteristischen makroskopischen Eigenschaften der DSCG-Lösungen. Die eindeutige Zuordnung durch eine Teilchengrößenbestimmung der dispersen Phase wurde nicht vorgenommen.

Mesophasen in sehr hohen DSCG-Konzentrationen sprechen allerdings wiederum für Assoziationskolloide.

Die Bildung flüssig-kristalliner Phasen von DSCG wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung der ungewöhnlichen Wasseraufnahmefähigkeit der Substanz studiert [175]. Nach diesen Untersuchungen assoziieren bis zu 260 Moleküle unter Einbeziehung von Wassermolekülen durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen [172]. Auch hydrophobe Wechselwirkungen im Inneren der Assoziate spielen dabei eine Rolle [176].

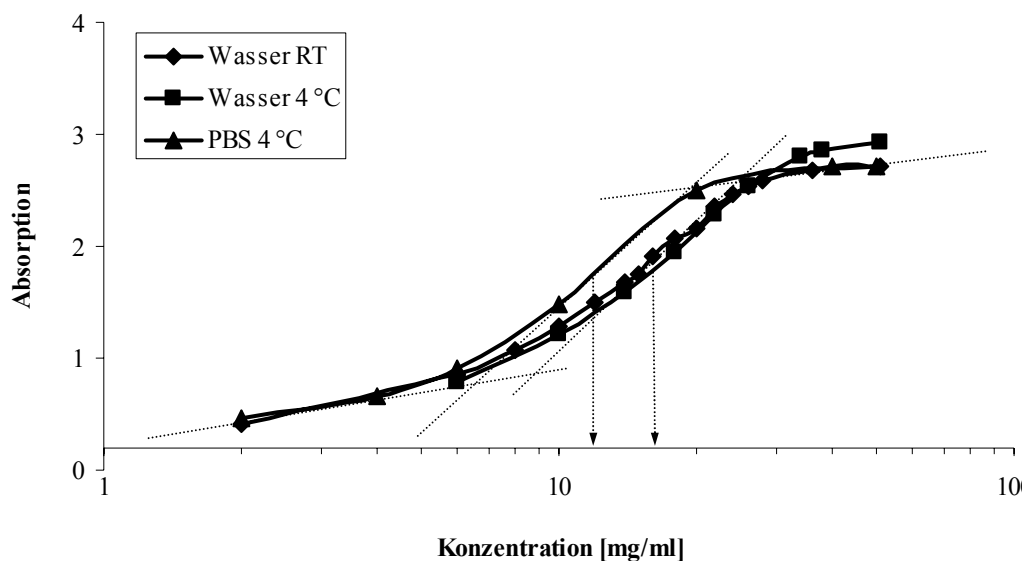


Abbildung 19: Photometrische Bestimmung der „CMC“ von DSCG

Das Vorliegen von assoziierten DSCG-Molekülen wurde für Konzentrationen über 10 mg/ml in der Literatur beschrieben [175]. Anzunehmen ist durch die vorliegenden Untersuchungen, dass in etwa 10 mg/ml der kritische Konzentrationsbereich ist, in dem die Assoziatbildung anhand der Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Lösungen eindeutig nachweisbar ist (Abb. 18, 19). Champion et al. [175] geben aber auch an, dass bereits ab 5 mg/ml starke intermolekulare Wechselwirkungen in den Lösungen einsetzen.

Sowohl die Assoziation einzelner Moleküle unterhalb der „CMC“ (< 10 mg/ml) als auch die Entstehung der kolloidalen Assoziate (> 10 mg/ml) können die konzentrationsabhängigen physikochemischen Eigenschaften der Lösungen und damit ihre Abweichung vom „normalen Verhalten“ eines starken Elektrolyten erklären.

Der strukturellen Aufklärung der entstehenden Assoziate konnte in dieser Arbeit kein Platz eingeräumt werden. Der Untersuchung des Einflusses der Formulierungsparameter auf relevante physikalisch-chemische Parameter der DSCG-Lösungen in Hinblick auf eine veränderte Permeabilität an der biologischen Membran kam ungleich mehr Bedeutung zu. Im

Folgendes wird vor allem der Einfluss der Konzentration auf das Permeationsverhalten von DSCG in PBS an der synthetischen und biologischen Membran untersucht.

B In-vitro-Permeation

Diffusion beruht auf der Eigenbeweglichkeit der Teilchen durch Brownsche Molekularbewegung unter der Triebkraft eines bestehenden Konzentrationsgradienten. Bei einem **membrankontrollierten** System sind, wie bereits erwähnt (↓ 4.2.1.2), im „quasi-stationären“ Zustand die Konzentrationen in Donator und Akzeptor verschieden; der Konzentrationsgradient in der Membran ist jedoch konstant. Mit zunehmendem Konzentrationsgradienten zwischen Donator und Akzeptor sollten die Permeabilitätsraten, d. h. der Stoffdurchtritt pro Zeiteinheit [$\mu\text{g}/\text{min}$] in dem Maße ansteigen wie sich die Konzentration der permeierenden Substanz im Donator erhöht. Tatsächlich folgt die Stärke des Diffusionsflusses aber der thermodynamischen Aktivität, der sogenannten „effektiven Konzentration“ eines Stoffes [134, 177], was dazu führen kann, dass sich die P_{app} für verschiedene Konzentrationen einer Substanz unterscheiden.

Die Betrachtung der Permeationsdaten von DSCG durch Nephrophan[®] (Tab. 16) veranschaulicht diese Tatsache. Mit steigender Konzentration steigt der Flux und damit die effektive Konzentration im Akzeptor Q_{60} [μg]. Da aber die Zunahme des Stoffdurchtrittes nicht der angenommenen, zur Berechnung genutzten Konzentration folgt, sondern der thermodynamischen Aktivität, sinken die prozentual permeierte Menge und der Permeabilitätskoeffizient [177]. Es besteht also ein Unterschied zwischen „effektiver“ und „absoluter“ Konzentration der DSCG-Lösungen.

Tabelle 16: Einfluss der Konzentration von DSCG auf die Permeation durch Nephrophan[®]

DSCG [mg/ml]	$P_{\text{app}} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [μg]	Q_{60} [%]
2	$2,68 \pm 0,13$	$379,65 \pm 24,03$	$6,35 \pm 0,38$
4	$2,49 \pm 0,14$	$703,01 \pm 36,93$	5,86
6	$2,27 \pm 0,05^*$	$1002,55 \pm 8,25$	5,57
8	$2,24 \pm 0,04^*$	$1268,30 \pm 17,12$	5,28
10	$2,26 \pm 0,06^*$	$1628,92 \pm 89,35$	5,43
20	$1,88 \pm 0,08^*$	$2631,31 \pm 142,93$	$4,39 \pm 0,24$
30	$1,67 \pm 0,05^*$	$3851,73 \pm 97,82$	4,30
40	$1,46 \pm 0,05^*$	$4350,08 \pm 146,81$	3,64

* signifikant verschieden von 2 mg/ml (t -Test)

Der Einfluss der „effektiven“ Konzentration zeigt sich dabei bereits im Bereich der auftretenden intermolekularen Wechselwirkungen einzelner Moleküle ($c > 4$ mg/ml). Bei einer Konzentration oberhalb von 10 mg/ml kann erkannt werden, dass neben der thermodynamischen Aktivität auch die Beweglichkeit der Teilchen mitbestimmend für den kinetischen Ablauf der Diffusion ist [78]. Die Bildung der assoziierten Kolloide reduziert die „effektive“ Konzentration an DSCG deutlich und nimmt über deren Größe und daraus resultierend über die steigende Viskosität (Abb. 18) einen zusätzlich diffusionsmindernden Einfluss [134, 159].

Tabelle 17 und Abbildung 20 zeigen die Daten, die nach Permeation von DSCG in Abhängigkeit von der Konzentration durch Rindernasenschleimhaut gewonnen wurden.

Tabelle 17: Permeation von DSCG in Abhängigkeit von der Konzentration durch Rindernasenschleimhaut

DSCG [mg/ml]	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [µg]	Q_{60} [%]
2	$1,41 \pm 0,23$	$185,09 \pm 74,42$	3,01
4	$0,88 \pm 0,096$	$256,16 \pm 66,46$	2,13
6	$1,11 \pm 0,15$	$484,96 \pm 138,29$	2,69
8	$1,59 \pm 0,24$	$889,44 \pm 310,89$	3,71
10	$3,23 \pm 0,63^*$	$2268,65 \pm 1023,19$	7,56
20	$1,19 \pm 0,12$	$1490,99 \pm 494,80$	2,48

* signifikant verschieden von 2 mg/ml (*t*-Test)

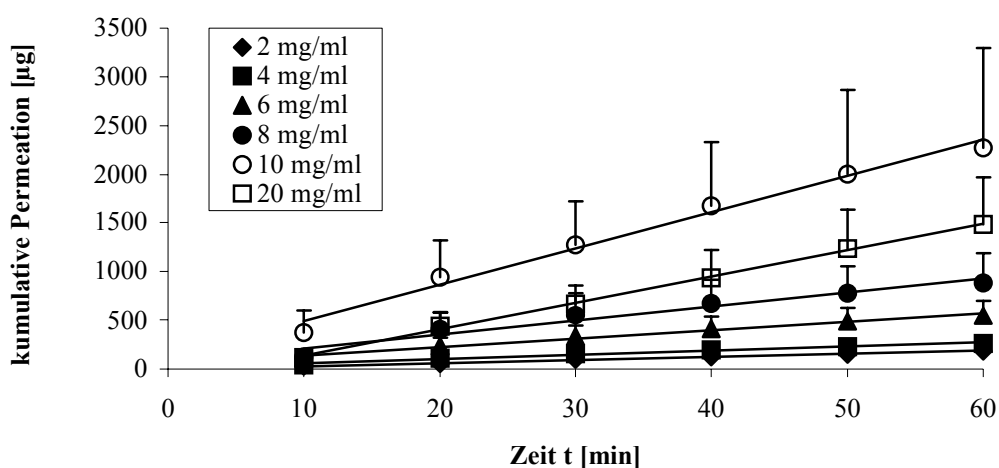


Abbildung 20: Einfluss der Konzentration auf die Permeation von DSCG durch Rindermukosa

Die P_{app} für Rindernasenschleimhaut (Tab. 17) zeigen, dass DSCG permeabilitätsverändernde Effekte an der Membran ausübt. Während zuerst eine deutliche Abnahme bei 4 mg/ml (einsetzende Assoziation einzelner Moleküle) vorliegt, steigen die P_{app} danach trotz sinkender thermodynamischer Aktivität (siehe Tab. 16) wieder an und erreichen bei 10 mg/ml ein Maximum, wobei allerdings lediglich dieser Maximalwert Signifikanz aufweist.

Ein selbstenhancer Effekt von DSCG an der Rindernasenschleimhaut scheint tatsächlich vorzuliegen [147], der jedoch eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit zeigt. Denkbar ist, dass die bereits beschriebene Wechselwirkung mit Komponenten des nasalen Mukus eine Rolle spielt.

Das Studium der Wechselwirkung von Natriumcromoglicat mit der Mucindispersion im rheologischen Teil dieser Arbeit zeigt ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit (↑ 4.3.3.3). Der Effekt von DSCG auf die rheologischen Parameter von Mucin ist erst ab einer Konzentration von 5 mg/ml eindeutig registrierbar und erfährt oberhalb 10 mg/ml keine weitere Zunahme (↑ 4.3.3.3).

So ist denkbar, dass die Wechselwirkung mit dem Mukus bei einer Konzentration von 4 mg/ml DSCG dominiert und dadurch die Möglichkeit der Wechselwirkung von DSCG mit Komponenten der Membran einschränkt. Mit weiterer Erhöhung der Konzentration erfährt die Mukuswechselwirkung eine „Sättigung“. Der Effekt auf die Permeabilität der Membran tritt stärker hervor. Oberhalb einer DSCG-Konzentration von 10 mg/ml behindern die entstehenden „kolloidalen“ Assoziate vermutlich weniger die Permeabilität der Membran, sondern vielmehr die Permeationsfähigkeit des assoziierten Arzneistoffes durch seine Größe. Während die verstärkten intermolekularen Wechselwirkungen von DSCG mit steigender Konzentration an der synthetischen Membran zu einer Abnahme der thermodynamischen Aktivität und damit der permeierten Menge DSCG führen (Tab. 16), scheinen sie hingegen an der Rindermukosa sowohl die „Membranaktivität“ der Substanz (Permeationssteigerung) als auch die Wechselwirkungen von DSCG mit den Mukuskomponenten der Membran zu begünstigen.

Ein möglicher Wirkungsmechanismus von DSCG zur Erklärung der In-vitro-Effekte an Rindermukosa lässt sich aus dem pharmakologischen Verhalten der Substanz ableiten, an dem sowohl indirekte calciumabhängige- als auch unabhängige Phosphorylierungsvorgänge beteiligt sind [101]. Die Erhöhung der Konzentration zyklischer Nukleotide fördert dabei Phosphorylierungsvorgänge von Proteinen, die die Plasmamembran mit dem Zytoskeletton der Zelle verbinden und die allergische Kaskade unterbrechen [100]. DSCG beeinflusst diesen Prozess durch Wechselwirkung mit den daran beteiligten Enzymen (Proteinkinase C, saure Phosphatase). Dabei wird die Substanz nicht an das aktive Zentrum der Enzyme gebunden. Viskositätsmessungen haben ergeben, dass der Effekt durch konformelle Änderungen in der Struktur der Enzyme hervorgerufen wird [99].

Es ist möglich, dass DSCG über unspezifische calciumabhängige und -unabhängige Mechanismen auf die Phosphorylierung junctionaler Proteine in gleicher Weise Einfluss nimmt. Die unspezifische Wirkung über konformelle Änderung der beteiligten Enzyme kann auch die Wechselwirkung mit der Mucinmodellldispersion erklären.

Zur Untermauerung dieser Hypothesen wurden Gleichgewichtsdialysen gegen eine äquimolare Menge Ca^{2+} sowie gegen einen Proteinstandard durchgeführt, die eine Gleichverteilung von Natriumcromoglicat in beiden Kompartimenten, entsprechend der halben Ausgangskonzentration, ergaben (Daten nicht dargestellt). Demzufolge waren Wechselwirkungen sowohl mit den Calciumionen im Sinne einer Komplexierung und Ausfällung [178] als auch mit den Proteinen selbst, als ursächlicher Grund für die beobachtete Enhancerwirkung von DSCG auszuschließen. Für diese Tatsache spricht auch der Umstand, dass durch im Donator enthaltenes EDTA eine permeationsfördernde Wirkung auftrat (↓ 4.2.2.1, Tab. 11). Die tendenzielle Möglichkeit, in den Donatoren der Permeationsstudien zur Erfassung der In-vitro-Penetration von DSCG in Rindermukosa Proteine nachweisen zu können (↓ 4.2.2.3), zeigt, dass vermutlich eine Wechselwirkung mit den junctionalen Proteinkomponenten vorliegt [57]. Andererseits ist es denkbar, dass der Nachweis von Proteinen auf eine verstärkte Auswaschung von Mucinglykoproteinen durch Wechselwirkungen mit DSCG zurückzuführen ist (↑ 4.3.2, Tab. 26) [166].

Schmidt et al. [67] halten den hier postulierten Effekt von DSCG auch bei einigen immunmodulatorischen Proteinen für denkbar und stellten eine Erhöhung des Fluxes einer parazellulären Markersubstanz fest. Der TEER-Wert des biologischen Gewebes veränderte sich dabei nicht nachweisbar.

Da DSCG seinen eigenen parazellulären Transport verstärkt (↓ 4.2.2.1), ist anzunehmen, dass eine Vorinkubation mit dieser Substanz auf die Permeabilität der Membran Einfluss nimmt und z. B. den Transport der parazellulären Markersubstanz Fluorescein-Natrium (FLU) ebenfalls verstärkt. Dabei sollte eine Konzentrationsabhängigkeit der Enhancerwirkung zu beobachten sein.

Bei Permeationsstudien von zwei anderen Arbeitsgruppen mit DSCG als hydrophiler Modellsubstanz an tierischem exzidiertem nasalem Gewebe konnte keine Veränderung des TEER-Wertes durch DSCG-Zusatz festgestellt werden [63, 179]. Auch morphologische Veränderungen bei nachträglicher lichtmikroskopischer Untersuchung dieses Gewebes waren nicht feststellbar [63].

4.3.1.2 Vorinkubation der Mukosa mit Natriumcromoglicat

Nasale Enhancereffekte können allgemein durch Wechselwirkungen mit:

- dem Mukus (Verbesserung der Diffusion durch die Mukusschicht durch Erniedrigung ihrer Viskosität und Elastizität),
- den epithelialen Zellen (Verbesserung parazellulärer (Wechselwirkung mit junctionalen Proteinen) und transzellulärer Transportprozesse (Veränderung der Membranfluidität)),
- den Zilien (Erniedrigung der MCC durch Reduzierung der Zilienschlagfrequenz (CBF)),
- den Enzymen der Nasenschleimhaut (durch Zusatz von Enzyminhibitoren Reduzierung von Instabilitäten [180]) sowie
- durch die Erhöhung der Verweildauer infolge Mukoadhäsivität [166] und
- die Verbesserung der Arzneistofflöslichkeit [181]

hervorgerufen werden [22]. Häufig ist eine Kombination mehrerer Effekte Ursache für den enhancenden Effekt einer Substanz. Im In-vitro-Permeationsmodell können aber lediglich arzneistoffbedingte Faktoren (Löslichkeit, Stabilität, Wechselwirkungen mit Formulierungskomponenten), Effekte auf die Membran und mit Einschränkung Einflüsse auf den Mukus festgestellt werden [43].

Der Verträglichkeitsprüfung der Enhancer auf ihre lokale und systemische Toxizität kommt große Bedeutung zu. Für viele Enhancer konnte durch verschiedenartigste Methoden (morphologische Untersuchungen, CBF-Studien, Freisetzung von Markersubstanzen) eine Korrelation zwischen enhancender Wirkung und membranschädigenden Eigenschaften gezeigt werden [163]. Diese Tatsache ist jedoch im Umkehrschluss nicht immer richtig [150]. Zum anderen gilt es zu bedenken, dass eine erhöhte Permeabilität für Arzneistoffe zugleich auch eine erhöhte Permeabilität für Noxen (z. B. Allergene) [67] bedeuten kann.

Tabelle 18 und Abbildung 21 stellen die Ergebnisse der Vorinkubationsversuche mit Natriumcromoglicat dar.

Tabelle 18: Permeation von FLU (100 µM) aus EBS nach Vorinkubation der Mukosa mit DSCG (mg/ml)

Vorinkubation		$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [µg]	Q_{60} [%]
keine		$1,08 \pm 0,02$	$2,52 \pm 0,82$	2,25
10 min	DSCG/2	$0,37 \pm 0,01^*$	$0,92 \pm 0,58$	0,82
	DSCG/10	$0,58 \pm 0,02$	$1,64 \pm 0,96$	1,46
	DSCG/20	$0,34 \pm 0,005$	$0,82 \pm 0,06$	0,73
20 min	DSCG/2	$1,22 \pm 0,02^*$	$3,45 \pm 0,87$	3,07
	DSCG/10	$1,30 \pm 0,56$	$4,29 \pm 2,78$	3,82
	DSCG/20	$0,02 \pm 0,004$	$0,56 \pm 0,17$	0,50

* signifikant verschieden von FLU ohne Vorinkubation (*t*-Test)

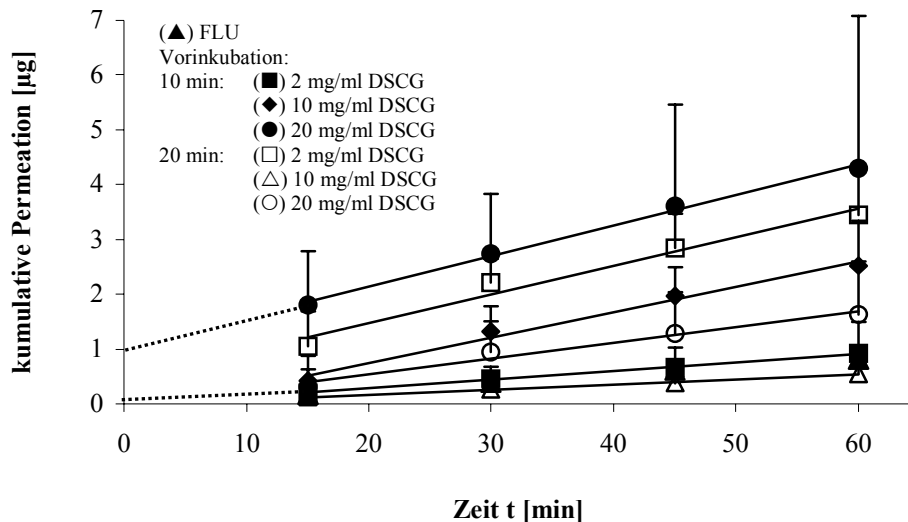


Abbildung 21: Einfluss der Vorinkubation mit DSCG (PBS) auf die Permeation von FLU

Neben der bereits beschriebenen und erwarteten Konzentrationsabhängigkeit der Enhancerwirkung ist eine zusätzliche Zeitabhängigkeit der DSCG-Einwirkung auf die Membran aus den erhaltenen Daten zu erkennen. Für viele klassische Enhancer sind solche konzentrations- und zeitabhängigen Effekte beschrieben worden [141, 148, 182].

Sowohl die Stärke des enhancenden Effektes auf die Permeation von FLU nach Vorinkubation mit 2 bzw. 10 mg/ml, als auch die mit 20 mg/ml auftretende deutliche Reduktion der Werte zeigen, dass der selbstenhancende Effekt eine für die Substanz mehr oder weniger spezifische Komponente aufweist. Die kolloidalen Assoziate treten wiederum als limitierender Faktor hinsichtlich Größe und/oder Möglichkeit zur Enhancerfunktion auf.

Die nach 10minütiger Vorinkubationszeit auftretende Abnahme der Permeabilität für FLU lässt sich durch die Zeitabhängigkeit der Enhancereinwirkung erklären [148]. Es ist denkbar, dass das Adhäsionspotential der Substanz DSCG zu einer vorübergehenden „Belegung“ der Absorptionsfläche führt.

Bei längerer Einwirkungsdauer kommen dann die Effekte auf die Membran zum Tragen. Dass DSCG die Permeabilität der Membran beeinflussen muss, lässt sich an den y-Achsenabschnitten (yA) der Geraden der graphischen Darstellung des Permeationsverlaufes deutlich erkennen (Abb. 21, yA_{Flu} (0,17 μg) signifikant (t -Test) $< yA_{\text{Flu DSCG 10 mg/ml 10 min}}$ (1,02 μg)). Obwohl die P_{app} keine markante Veränderung (Tab. 18, $P_{\text{app Flu}}$ nicht signifikant (t -Test) $< P_{\text{app Flu DSCG 10 mg/ml 10 min}}$) erfahren, erhöhte sich die prozentual permeierte Menge FLU deutlich. Daraus kann geschlussfolgert, dass die Geschwindigkeit des Stoffdurchtrittes von FLU durch die Membran mit und ohne DSCG-Vorinkubation nahezu gleich ist, während sich die für die Diffusion von FLU zur Verfügung stehende Querschnittsfläche („geöffnete Poren“) vergrößert.

Das Adhäsionspotential von DSCG scheint auch für die deutliche Abnahme der permeierten Menge FLU nach Vorinkubation mit 20 mg/ml DSCG verantwortlich zu sein. Während bei geringerer Konzentration von DSCG die permeabilitätserhöhende Wirkung nach DSCG-Vorinkubation der Membran auch für die Permeation von FLU relevant ist, blockiert das DSCG-Assoziat, bestehend aus bis zu 260 Molekülen, die Permeationsfläche nahezu vollständig. In der Literatur wurde z. B. für Ammoniumglycyrrhinat eine Abhängigkeit seiner Enhancerwirkung bis zu einer bestimmten Molekülmasse des Permeanten beschrieben [139]. Donovan et al. [183] geben an, dass innerhalb enger Grenzen aus einer Zunahme der Molekülmasse eine deutliche Reduzierung des Enhancereffektes resultiert.

Die im Komplex 4.3.1.1 aufgestellte Hypothese, dass die Mukuswechselwirkung von DSCG die Membranaktivität dominiert, bestätigt sich durch diese Versuche. Der hier besonders deutliche Effekt mag ursächlich damit zusammenhängen, dass während der verkürzten Vorinkubationsphase mit EBS weniger Mukuskomponenten von der Membran entfernt werden konnten.

Auf die Permeation von FLU durch Nephrophan[®] hatte die Vorinkubation mit DSCG erwartungsgemäß keinen Einfluss (*t*-Test) (Daten in 7.4 dokumentiert).

4.3.1.3 Einfluss von Polysorbat

Permeationsstudien mit dem FAM Vividrin[®] ergaben eine Abnahme des P_{app} von DSCG unter Verwendung von Nephrophan[®] und eine Zunahme bei Rindernasenschleimhaut (↓ 4.2.1.2). Als Ausnahme unter den FAM enthält Vividrin[®] Polysorbat 80 (PS 80). Da außerdem auch EDTA enthalten ist, wurde zum Vergleich auch die Kombination Polysorbat 80 mit EDTA in die Modelluntersuchungen einbezogen.

Die Bestimmung der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von Polysorbat 80 (Abb. 22) in PBS und Gereinigtem Wasser zeigte, dass die CMC dieses Tensides über 0,005 % (m/V) liegt. Sie wird durch das Lösungsmittel nicht beeinflusst. Die Ergebnisse der tensiometrischen CMC-Bestimmung wurden in die folgenden Betrachtungen nicht mit einbezogen (↑ 7.5). Durch den DSCG-Zusatz wird die Oberflächenaktivität der Lösungen kaum beeinflusst (Tab. 19).

Da die Konzentration an PS 80 weder der Packungsbeilage von Vividrin[®] noch der Fachinformation zu entnehmen war, wurde mittels Eosin-Natrium der Nachweis von Mizellen – Änderung des Absorptionsspektrums des Farbstoffs durch Einlagerung in die Mizellen – versucht. Während sich mit PBS, Gereinigtem Wasser und 20 mg/ml DSCG in PBS keine Absorptionsänderung zeigte, erfolgte bei Testung von Vividrin[®] eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums (Daten nicht dargestellt). Somit ist davon auszugehen, dass die Polysorbat 80-Konzentration in Vividrin[®] oberhalb von 0,005 % (m/V) liegt.

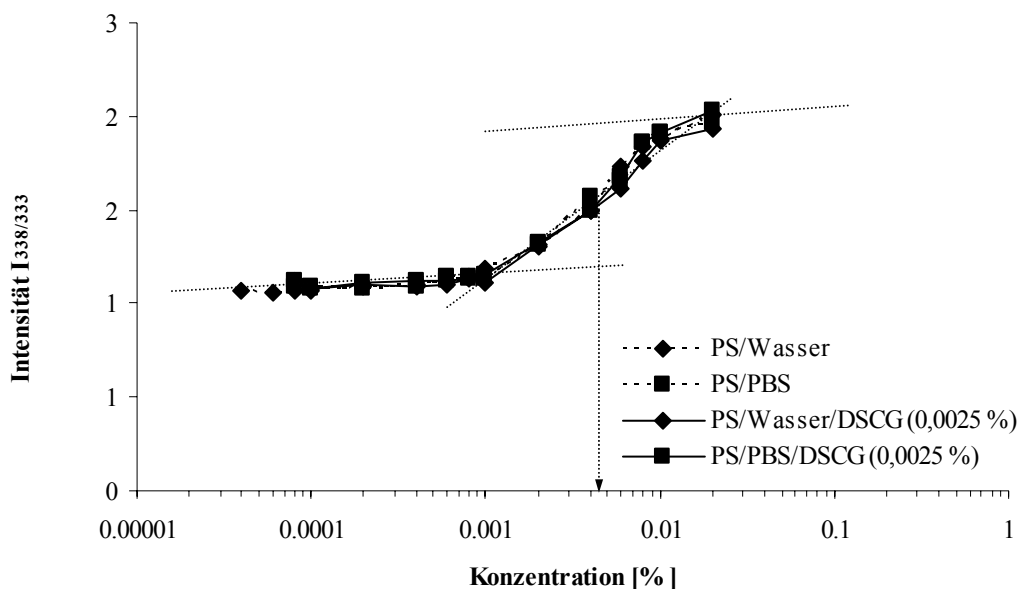


Abbildung 22: Fluorimetrische CMC-Bestimmung von Polysorbat 80

Tabelle 19: Oberflächenspannungen [mN/m] von PS 80 mit und ohne Zusatz von DSCG (mg/ml), VK von DSCG in Polysorbat 80-Lösungen verschiedener Konzentration

	<i>Polysorbat 80 [%] (m/V) in PBS</i>					
	<i>Oberflächenspannungen</i>			<i>VK DSCG</i>		
	0,005	0,01	0,1	0,005	0,01	0,1
	44,64	42,34	40,90			
+ DSCG/2	n. b.	42,61	n. b.	≅ 0	≅ 0	≅ 0
+ DSCG/20	n. b.	40,45	n. b.	n. b.	0,064 ± 0,017	n. b.

n. b. nicht bestimmt

Eine mögliche Veränderung der Lage der CMC des Tensides durch die Kombination mit DSCG konnte durch den fluoreszenzlöschenden Effekt von DSCG ($> 0,0025$ % (m/V)) bei der fluorimetrischen Bestimmung der CMC des Tensides mittels Pyren (↑ 5.2.1.8) nicht untersucht werden. Der Verteilungskoeffizient von DSCG betrug für eine Konzentration von 2 mg/ml bei allen drei untersuchten Tensidkonzentrationen Null (Tab. 19). Für 20 mg/ml in PBS wurde in Anwesenheit von PS 80 0,01 % (m/V) ein VK von $0,064 \pm 0,017$ ermittelt.

Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der DSCG-Permeationsversuche mit Polysorbat 80 (% (m/V)) und/oder EDTA unter Verwendung von Rindernasenschleimhaut.

Tabelle 20: Einfluss von Polysorbat 80 und EDTA auf die DSCG-Permeation durch-Rindernasenschleimhaut

Formulierung	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [µg]	Q_{60} [%]
DSCG (0,0039 M)			
Referenz	1,41 ± 0,23	185,09 ± 74,42	3,01
+ 0,005 % PS	2,19 ± 0,52	331,62 ± 209,43	5,53
+ 0,01 % PS	0,85 ± 0,15	114,61 ± 71,94	1,91
+ 0,1 % PS	0,46 ± 0,15*	66,44 ± 42,82	1,11
+ 0,1 % EDTA	2,17 ± 0,42	274,75 ± 168,26	4,58
Vorinkubation EDTA 0,1 %	1,31 ± 0,20	190,29 ± 60,86	3,17
+ 0,01 % PS + 0,1 % EDTA	1,31 ± 0,25	180,44 ± 85,59	3,01
DSCG (0,039 M)			
Referenz (20 mg/ml)	1,19 ± 0,12	1490,99 ± 494,80	2,48
+ EDTA 0,1 %	1,59 ± 0,27	2510,04 ± 630,50	4,18
+ PS 0,01 % + EDTA 0,1 %	2,11 ± 0,36	3004,14 ± 1024,88	5,01
Vividrin®	2,68 ± 0,36*	3810,86 ± 1187,54	6,04

* signifikant verschieden von der jeweiligen Referenz (t-Test)

Der Effekt von Polysorbat 80, ggf. in Kombination mit EDTA, auf das Permeationsverhalten von DSCG unterscheidet sich bei den zwei untersuchten DSCG-Konzentrationen deutlich. Für die nichtkolloidale Lösung (**DSCG 2 mg/ml** in PBS) sind folgende Feststellungen zu treffen:

- Das Vorliegen mizellarer PS-Lösungen (> 0,005 %) scheint einen permeationsmindernden Einfluss zu haben. Eine Wechselwirkung zwischen DSCG und Tensid im Sinne einer „polaren Fixierung“ von DSCG in/an den Mizellen, die sowohl die Membranaktivität des Arzneistoffes als auch die des Tensides behindert, wäre denkbar. Diese Vermutung ist auch aus der Kombination von PS 80 (0,01 % (m/V)) mit EDTA abzuleiten. Hier gelangt lediglich der enhancende EDTA-Anteil zur Wirkung, belegt durch den Versuch mit EDTA-vorinkubierter Membran, d. h., der DSCG-Effekt auf die Membran fehlt. Da bei einem Permeationsversuch mit Nephrophan® (siehe 7.4) keine Permeationsminderung von DSCG aus den mizellaren Polysorbatlösungen feststellbar war, scheint an der biologischen Membran ein verändertes Dissoziationsverhalten der DSCG/Tensid-Mischmizellen vorzuliegen.
- Der Zusatz des oberflächenaktiven Tensides in Konzentrationen unterhalb seiner CMC (0,005 %) scheint hingegen die Permeation von DSCG durch die Rindermukosa zu fördern. Sowohl die Membranaktivität von DSCG als auch die des

Tensides, die in der nichtmizellaren PS-Lösung nicht behindert erscheinen, können dabei an der deutlich erhöhten Permeation von DSCG bei Verwendung der Kombination aus PS 80 (0,005 %) und DSCG (2 mg/ml) beteiligt sein. Evrard et al. [184] fanden für Polysorbat 20 bei einer Konzentration unterhalb der CMC eine deutlich höhere Membranaktivität als im Bereich der CMC.

Die Kombination der kolloidalen Lösungen von **DSCG (20 mg/ml)** und Tensid, wie in Vividrin[®], führt zu einer erhöhten Permeabilität der Membran. Eine Wechselwirkung beider Komponenten scheint die Assoziatbildungen der jeweiligen Einzelsubstanz zu beeinträchtigen, und dadurch gleichermaßen eine Membranaktivität beider Substanzen zu ermöglichen. Für Cyclodextrine wurde als z. B. ein möglicher Grund für ihre Enhancerwirkung auf den Insulintransport an der nasalen Membran eine solche Störung der Selbstassoziation des Arzneistoffes genannt [185].

Die durchgeführten Versuche können zwar erklären, warum Vividrin[®] die Permeabilität der biologischen Membran erhöht, nicht aber den permeationsmindernden Effekt an der synthetischen Membran (Tab. 7). Da die nachgestellten DSCG-Rezepturen mit mizellaren Konzentrationen von Polysorbat das Permeationsverhalten von DSCG (20 mg/ml) durch Nephrophan[®] nicht beeinflussten (Daten in 7.4 dokumentiert), können nur weitere Bestandteile des Fertigarzneimittels für die reduzierte In-vitro-Verfügbarkeit durch Nephrophan[®] verantwortlich sein. Neben der Arzneistoffkonzentration scheinen die Pufferbestandteile und/oder Isotonisierungsmittel die In-vitro-Verfügbarkeit von DSCG sowohl an der biologischen als auch an der synthetischen Membran deutlich zu beeinflussen.

4.3.1.4 Einfluss des Konservierungsmittels

In Komplex 4.2.2.1 wurde die permeationsmindernde Wirkung von BAC auf die Permeation von DSCG (2 mg/ml) durch Rindernasenschleimhaut (Tab. 11) bereits beschrieben. Durch die Bildung eines Ionenpaares zwischen DSCG und BAC tritt dabei vermutlich die membranschädigende Wirkung des Konservierungsmittels in den Hintergrund. Die folgenden Versuche mit Thiomersal als nachweislich membranschädigendes Konservierungsmittel [16, 160] und Phenylethanol als verträgliches konservierendes Agens sollen diese Hypothese untermauern.

Die CMC von BAC (Abb. 23) liegt deutlich über der in den Versuchen verwendeten Konzentration von 0,01 % (m/V), d. h. die Mizellbildung in den getesteten Versuchslösungen hat noch nicht nachweisbar eingesetzt. Ihre Lage zeigt im Gegensatz zu der des nichtionischen Tensides Polysorbat 80 eine Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel. Sie wird sogar durch den geringen Zusatz von DSCG (0,0025 % (m/V)) beeinflusst. Die Oberflächenspannung der DSCG-haltigen (2, 20 mg/ml) Lösung von BAC 0,01 % (m/V) in PBS (43,26 mN/m) – der in den Permeationsversuchen verwendeten Konzentration – verändert sich geringfügig (Daten

nicht dargestellt). Der Verteilungskoeffizient von DSCG (2 mg/ml) steigt im vorliegenden Konzentrationsverhältnis beider Substanzen auf das Doppelte des PBS-Wertes ($VK_{\text{PBS}} (0,128 \pm 0,008) < VK_{\text{PBS/BAC}} (0,210 \pm 0,008)$). Das spricht für die Bildung eines lipophilen Ionenpaares unter den suchsbedingungen.

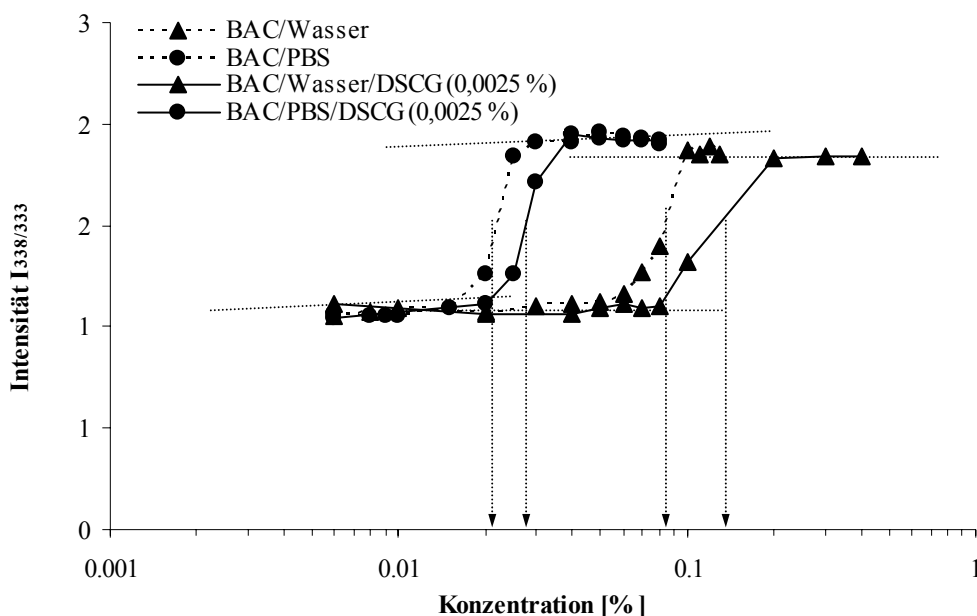


Abbildung 23: Fluorimetrische CMC-Bestimmung von BAC

Tabelle 21 fasst die Ergebnisse der Permeationsversuche unter Einsatz der alternativen Konservierungsmittel an der biologischen Membran zusammen. Abbildung 24 stellt die Permeationsverläufe für Rindernasenschleimhaut graphisch dar.

Tabelle 21: Einfluss der Konservierungsmittel [% (m/V)] auf die DSCG-Permeation durch Rindernasenschleimhaut

	$P_{\text{app}} \times 10^{-5} [\text{cm/s}]$	$Q_{60} [\mu\text{g}]$	$Q_{60} [\%]$
Referenz	$1,41 \pm 0,23$	$185,09 \pm 74,42$	$3,01$
+ Phenylethanol 0,5 %	$1,34 \pm 0,27$	$206,22 \pm 91,49$	$3,44$
+ Thiomersal 0,01 %	$1,78 \pm 0,29$	$284,88 \pm 68,29$	$4,75$
+ BAC 0,01 %	$0,50 \pm 0,09^*$	$53,16 \pm 18,73$	$0,89$
Vorinkubation Thiomersal 0,01%	$2,47 \pm 0,47$	$408,71 \pm 142,51$	$6,81$

* signifikant von Referenz (*t*-Test)

Die Permeationsversuche unterstützen erneut die Vermutung, dass durch die Bildung des DSCG/BAC-Ionenpaares die potenziell schädigende Wirkung von BAC in den Hintergrund tritt, denn Thiomersal als ausgewiesene membranschädigende und ziliotoxische Substanz führt insbesondere nach Vorinkubation der Membran zu einer erhöhten Permeabilität derselben Membran für DSCG. Der Vorinkubationsversuch unterstreicht dabei gleichzeitig die Bedeutung der Equilibrierungsphase vor dem eigentlichen Permeationsversuch für die Vitalität des Gewebes. Die Toxizität von Thiomersal ist in Anwesenheit von DSCG insofern deutlich höher als die von BAC. Phenylethanol scheint die Integrität der Mukosa nicht zu beeinträchtigen.

Da die beschriebenen Effekte unter Verwendung von Nephrophan® (Daten in 7.4 dokumentiert) nicht zu beobachten sind, kommen die Veränderungen im Permeationsverhalten an der biologischen Membran durch den direkten Einfluss der Zusätze auf diese Membran (Thiomersal) oder durch den indirekten Einfluss auf die permeierende Substanz (BAC) zustande.

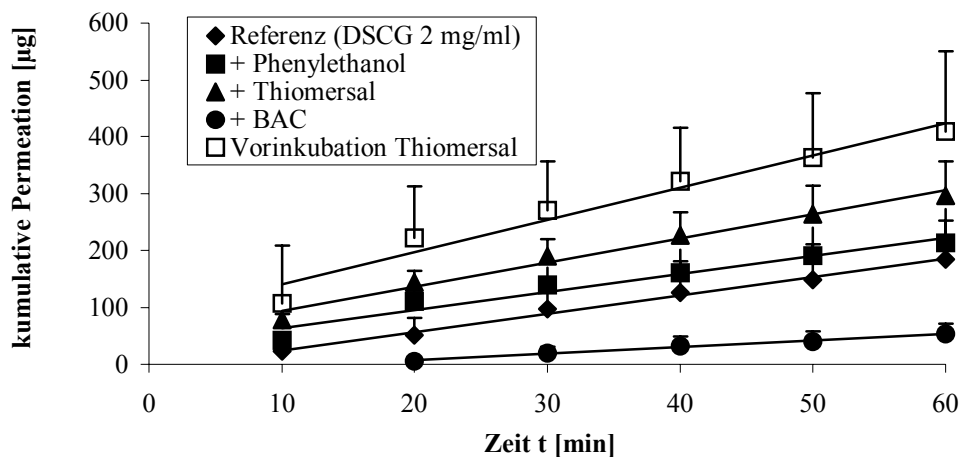


Abbildung 24: Einfluss verschiedener Konservierungsmittel auf die Permeation von DSCG durch Rindermukosa

4.3.1.5 Einfluss des Isotonisierungsmittels und Puffers

Kolloidale Lösungen assoziierter, ionischer Moleküle weisen zumeist eine ungewöhnliche Elektrolytempfindlichkeit auf [159], die sich im Falle der PBS-haltigen DSCG-Lösungen bereits bei den Messergebnissen der dynamischen Viskosität gezeigt hat (↓ 4.3.1.1). Es ist mithin nicht auszuschließen, dass sich durch Elektrolytzusatz auch physikalisch-chemische Eigenschaften der DSCG-Lösungen mit Relevanz auf die Permeabilität der biologischen Membran ebenfalls ändern.

Ein „Einsalzeffekt“ liegt vor, wenn die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungs-Fehlstellen zwischen den Wassermolekülen durch Elektrolytzusatz erhöht wird; die Fähigkeit zur

Solvation kolloidaler Teilchen wird verbessert. Ersetzen extrem hydrophile, Wasserstoffbrücken ausbildende Substanzen selber bestehende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wasserstoffmolekülen, spricht man von **Hydrotropierung** [174]. Von einem „**Aussalzeffekt**“ wird gesprochen, wenn das Wasser durch zugesetzte Elektrolyte hydrophober wird, d. h. der Anteil an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen wird erhöht [159]. Bei geladenen Substanzen können elektolytbedingte Entladungsvorgänge der Kolloide eine zusätzliche Rolle spielen.

Bei dem Versuch, das Verhalten von DSCG-Lösungen in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer zu erklären, muss wiederum zwischen der „kolloidalen“ Lösung (20 mg/ml DSCG) und der Lösung mit nichtkolloidal assoziierten Molekülen (2 mg/ml DSCG) unterschieden werden.

„Kolloidale“ Lösung

Wie bereits gezeigt (↓ 4.3.1.1), wird die **Bildung** der „kolloidalen“ Lösung von DSCG weder durch die Temperatur noch durch einen Elektrolytzusatz (PBS) beeinflusst. Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften ändern sich jedoch in Abhängigkeit von diesen beiden Parametern stark. Die Untersuchung der Viskosität (Tab. 22), Tonizität und Leitfähigkeit (Daten in 7.4 dokumentiert) der Lösungen von DSCG (20 mg/ml) in den Puffersystemen (mit und ohne Isotonisierungsmittel) der Permeationsstudien zeigte, dass

- mit steigender Ionenstärke die Wechselwirkungen innerhalb der Assoziate deutlich verstärkt werden, so steigt z. B. die dynamische Viskosität deutlich an (Tab. 22). Ein „Aussalzeffekt“ liegt vor. Die starke Temperaturabhängigkeit (↓ 4.3.1.1) der Viskositätszunahme spricht für zusätzlich entstehende Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Assoziate.
- die „Art“ der zugesetzten (Na^+ , Cl^-) bzw. in den Puffern ($(\text{HPO}_4)^{2-}$, Na^+ , $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$) enthaltenen Ionen kaum eine Rolle spielt (Tab. 22).

Tabelle 22: Einfluss der Ionenstärke μ des Puffers auf die dynamische Viskosität η [mPas] der entsprechenden DSCG-Lösung (20 mg/ml)

	PBS [mOsmol/kg]				isoton		
	280	350	170	70 ohne	+ Sorbitol	+ Glukose	+ Natriumchlorid
μ	0,202	0,318	0,093	0,041	0,041	0,041	0,157
η	19,45	32,47	7,89	4,95	5,09	5,29	17,00

Entsprechend diesen Befunden lässt sich die Abnahme der permeierten Menge von DSCG aus den FAM Cromo ratiopharm[®] und Vividrin[®] durch Nephrophan[®] (Tab. 7) weniger auf einen Polysorbat- bzw. Tonizitätseffekt an sich zurückführen. So könnte z. B. der niedrige

Elektrolytgehalt in Cromo ratiopharm[®] eine verstärkte Wechselwirkung der kolloidalen Assoziate mit Wasser bewirken. Die Substanz selbst wird zum Hydrotropierungsmittel, ihre thermodynamische Aktivität sinkt und damit ihr P_{app} für Nephrophan[®]. An der biologischen Membran nimmt durch mögliche Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen die Fähigkeit zum Selbstenhancement ab.

Nichtkolloidale Lösungen

Bei den nichtkolloidalen Lösungen (2 mg/ml DSCG) können grundsätzlich die gleichen Feststellungen getroffen werden, nur mit der Einschränkung, dass eine starke Abhängigkeit der physikalisch-chemischen Eigenschaften der DSCG-Lösungen von den zugesetzten Ionen zusätzlich auftritt.

Tabelle 23 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Lipophilie, Ionenstärke und Permeationsverhalten an der biologischen und synthetischen Membran.

Tabelle 23: Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem VK von DSCG (2 mg/ml) sowie der Art der enthaltenen Ionen

Testlösung	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Gehalt Ionen ¹ [M]		Ionen-	VK
	Nephrophan [®]	Mukosa	Cl ⁻	(H _x PO ₄) ^{y-}	K ⁺ /Na ⁺	
Referenz	2,68 ± 0,13	1,41 ± 0,23	/	0,163	0,182	0,216
KBS	2,58 ± 0,062	2,84 ± 0,47*	0,110	0,050	0,160	0,166
List pH 6,0	n. b.	n. b.	/	0,066	0,077	0,088
PBS/70	2,58 ± 0,25	1,15 ± 0,19*	/	0,036	0,038	0,041
+ Glukose	2,43 ± 0,07*	0,80 ± 0,22*	/	0,036	0,038	0,041
+ NaCl	2,46 ± 0,04*	0,72 ± 0,07*	0,116	0,036	0,116	0,157
+ Sorbitol	2,36 ± 0,07*	0,82 ± 0,16*	/	0,036	0,038	0,055

¹ Angaben beziehen sich auf das verwendete Puffersystem.

* signifikant verschieden von Referenz in PBS (*t*-Test)

n. b. nicht bestimmt

KBS isotonischer Kaliumphosphatpuffer pH 6,0

List Phosphatpuffersystem nach List

Bei der Betrachtung der Daten in Tabelle 23 muss geschlussfolgert werden, dass mit zunehmender Ionenstärke (z. B. $\mu_{List\ pH\ 6,0}$ (0,088) < $\mu_{PBS\ pH\ 6,0}$ (0,216)) verstärkt hydrophobe intermolekulare Wechselwirkungen zwischen einzelnen DSCG-Molekülen im Sinne eines „Aussalzeffektes“ induziert werden. Die Verteilungskoeffizienten aus solchen Systemen sind höher (Tab. 9, 22; $VK_{List\ pH\ 6,0}$ (0,038) < $VK_{PBS\ pH\ 6,0}$ (0,128)); die Lipophilie der Substanz steigt also. Dabei nimmt nicht nur die Ionenstärke selbst einen Einfluss, sondern auch die Art der

Ionen. So scheinen das Phosphat- und Kaliumion die hydrophoben intermolekularen Wechselwirkungen zu begünstigen, das Chlorid- und Natriumion dagegen nicht (Tab. 23). Im Gegensatz dazu führt z. B. der Zusatz von Sorbitol erwartungsgemäß zu einer deutlich zunehmenden Hydrophilie, im Sinne einer Hydrotopierung. Die Wechselwirkung zwischen Wasser- und DSCG-Molekülen wird begünstigt.

Auf das Permeationsgeschehen an der biologischen und synthetischen Membran wirken sich die beschriebenen vehikelabhängigen Eigenschaften der DSCG-Lösungen gleich mehrfach aus. Tendenziell scheinen dabei die intermolekularen hydrophoben Wechselwirkungen die Wirkung der Substanz auf die Membran und auf die Mukuskomponenten (nur $P_{app \text{ Mukosa}}$ steigt) zu fördern, zunehmende Hydrophilie und zunehmende Wechselwirkung mit Wasser schränken den Membraneffekt ($P_{app \text{ Mukosa}}$ sinkt) und die thermodynamische Aktivität ($P_{app \text{ Nephrophan}}^{\text{®}}$ sinkt) ein.

4.3.1.6 Resümee

Für das Permeationsverhalten von DSCG an Rindernasenschleimhaut wurden in ausgeprägter Weise Einflüsse von Formulierungsparametern erfasst. Dabei übt die Formulierung selbst weniger einen Einfluss auf die Permeabilität der biologischen Membran aus, sondern beeinflusst vielmehr die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen in den DSCG-Lösungen, wobei eine dominante Abhängigkeit von der DSCG-Konzentration besteht.

So ist die Abweichung gegenüber dem von Kubo et al. [63] angegebenen P_{app} für DSCG mit $0,343 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ an isolierter nasaler Kaninchenmukosa auf unterschiedliche Versuchsbedingungen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit zurückzuführen. DSCG wurde von Kubo et al. in einer Konzentration von 5,1 mg/ml in einem anderen komplexen Puffersystem eingesetzt. Vergleichbar damit ist die Konzentration von 4 mg/ml DSCG in PBS in den hier durchgeführten Permeationsstudien, die jedoch einen P_{app} von $0,88 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ ergab. Ebenso kann der abweichende P_{app} von Lucifer Yellow ($0,633 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$) [186], einer DSCG strukturell sehr ähnlich aufgebauten Substanz mit nahezu identischer Molekülmasse, mit der Vielzahl spezifischer Einflussparameter für DSCG auf den für eine Membran resultierenden Permeabilitätskoeffizienten erklärt werden.

Die Vergleichbarkeit der ermittelten Permeationsdaten von DSCG mit denen anderer Substanzen und solchen, die für DSCG nach Permeation unter anderen Versuchsbedingungen gewonnen wurden, ist kaum gegeben. Ursache dafür ist die starke Einflussnahme der Formulierungsparameter auf die physikalisch-chemischen Parameter von DSCG-Lösungen, die die Aktivität von DSCG an der Membran und seine thermodynamische Aktivität determinieren. Dabei muss berücksichtigt werden, dass DSCG aufgrund seiner Selbstassoziation nicht zu den „normalen“ Substanzen gehört.

4.3.2 In-vitro-Penetration

Es ist beschrieben worden, dass sich bei Patienten mit allergischer Rhinitis während der „Pollensaison“ eine vermehrte Anzahl Mastzellen, also der Effektorzellen der allergischen Reaktion, auch im Epithel der Nasenschleimhaut finden lässt [48]. Das aus diesen Mastzellen freigesetzte Histamin erhöht die Permeabilität der nasalen Schleimhaut für die Allergene und verstärkt somit die allergische Reaktion [14]. Die Frage nach der Menge DSCG, die nach der Applikation im Epithel zu finden ist, scheint somit berechtigt.

Als analytisch problematisch erwies sich die Durchführung von Penetrationsstudien dadurch, dass zum einen die verwendeten Membranen ein sehr geringes Trockengewicht besaßen und zum anderen die Menge des in die Membran penetrierten Arzneistoffes sehr gering war. Eine einfache Extraktion von DSCG aus den zerkleinerten Membranen nach Inkubation war ebenso ungeeignet, wie die Ermittlung der penetrierten DSCG-Menge anhand der Konzentrationsdifferenz zwischen Donator- und Akzeptorlösung bzw. der Konzentrationsabnahme in der Inkubationsflüssigkeit.

Als weitere Alternative zur Gehaltserfassung wurde der alkalische Aufschluss der Membran geprüft, der den Bezug der penetrierten Menge DSCG auf den Proteingehalt der Membran anstelle des Trockengewichtes ermöglicht. DSCG wurde dabei in das im Alkalischen entstehende Bisacetophenon überführt. Nach Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure konnte das entstandene farbige Produkt photometrisch vermessen werden. Die Kupplung des umgesetzten DSCG erwies sich als mögliches analytisches Verfahren, da ein linearer Zusammenhang ($R^2 = 0,995$) gefunden wurde. Als deutlicher Nachteil stellten sich aber die geringe Spezifität und Robustheit heraus.

Weitere Versuche, das alkalische Produkt von DSCG nach Membranaufschluss bzw. das entstehende Enol nach Ansäuern des aufgeschlossenen Membrangemisches mittels Flüssig-flüssig-Extraktion zu gewinnen und anschließend mittels HPLC zu quantifizieren, scheiterten.

Schließlich wurde nach einem Ultraschallaufschluss der Membran das Extraktionsverfahren der Plasmaanalytik (↑ 5.2.6) angewendet. Allerdings konnten die so ermittelten DSCG-Gehalte nur auf das Trockengewicht der Membran bezogen werden.

Im Rahmen der durchgeführten Penetrationsstudien wurde der Gehalt von DSCG in der biologischen Membran sowohl nach erfolgter Permeation als auch nach Inkubation mit der entsprechenden Lösung bestimmt. Da bei der Inkubation der Membranen die Agitation der Inkubationsflüssigkeit gering war und die Membranen keiner Equilibrierungsphase unterworfen wurden, ist davon auszugehen, dass die Mukusschicht nicht entfernt wurde. Durch das reduzierte Volumen der Donator- und Akzeptorkompartimente bei der Permeationsstudie wurde die Bestimmung der Proteingehalte (↑ 5.2.7) möglich. Neben den Mengen DSCG in der

Membran wurden die Gehalte in der Spülflüssigkeit nach beendetem Versuch erfasst. In Analogie zu den Permeationsstudien wurde stets der isotone Phosphatpuffer verwendet. Die Konzentrationen der getesteten Arznei- und Hilfsstoffe entsprachen ebenfalls den Permeationsversuchen.

4.3.2.1 Einfluss von Benzalkoniumchlorid und EDTA

Grundsätzlich sollte sich die penetrierte Menge einer Substanz aus einer Lösung in eine Schicht (Membran) von der nach einer Permeation als Resultat des Durchtrittes durch eine Schicht unterscheiden [78].

Für die Penetration von DSCG (2 mg/ml) unter dem Einfluss von BAC und EDTA kann Folgendes festgestellt werden (Tab. 24):

- Die penetrierten Mengen von DSCG nach Inkubation und Permeation unterscheiden sich signifikant voneinander (Referenz, (*t*-Test)). Die prozentual größere Menge DSCG, die aus dem Inkubationsansatz in die Rindermukosa penetriert ist, könnte zusätzlich durch die praktisch doppelt so große Penetrationsfläche (Vorder- und Rückseite der Mukosa) verursacht werden.
- Die Gewebespiegel von DSCG nach der **Permeation** korrelieren bezüglich der Einflussparameter mit den Ergebnissen (P_{app}) der Permeationsstudie (Tab. 11). Sie sind durch den enhancenden Effekt von EDTA (Öffnung von „Poren“) erhöht ($P_{app\ EDTA} > P_{app\ Referenz}$). Gleichzeitig kann aber auch für das Ionenpaar DSCG/BAC ein signifikant erhöhter Gewebespiegel festgestellt werden (*t*-Test). Das große „Doppelmolekül“ bleibt praktisch in den „Poren“ der Membran stecken ($P_{app\ Referenz} > P_{app\ BAC}$).
- Im **Inkubationsansatz** erwies sich der Einfluss der Formulierungsparameter BAC und EDTA auf die resultierenden Gewebespiegel von DSCG als geringer, zeigte jedoch die gleiche Tendenz.
- Eine Interpretation der DSCG-Mengen in den Spülflüssigkeiten erweist sich als schwierig. Im Inkubationsansatz stärker anhaftende Mukuskomponenten an der Membran könnten eine mögliche Ursache sein. Jedenfalls liegen die DSCG-Gehalte in den Spülflüssigkeiten 2-3mal so hoch wie im Gewebe.

Im Rahmen der durchgeführten Penetrationsstudien mit DSCG wurden die während der Inkubation oder Permeation freigesetzten Proteinmengen bestimmt (↓ 4.2.2.3). Tabelle 25 gibt über die Ergebnisse dieser Untersuchungen Auskunft.

Die bestimmten Gesamtproteine können Membranproteine, Enzyme oder dem Epithel anhaftende bzw. produzierte Mukusglykoproteine sein [164, 166]. Ihre Bestimmung am Ende des Versuches lässt keine Aussagen zum zeitlichen Verlauf ihrer Freisetzung zu. Häufig ist jedoch eine zeitlich lineare Freisetzung zu finden [165]. Zwischen der Menge freigesetzter

Proteine und der Membranpermeabilität für Testsubstanzen, d. h. indirekt der Enhancerfunktion, konnte, wie bereits festgestellt (↓ 4.3.1.2), eine Korrelation gefunden werden [164, 165]. Das heißt jedoch nicht, dass zwangsläufig jeder Enhancer ein membranschädigendes Potential besitzt [150] und umgekehrt freigesetzte Proteine immer auf eine Membranschädigung hindeuten. Die Extrapolation auf die In-vivo-Verträglichkeit nach Erfassung eines einzelnen Effektes ist schwierig, denn sie ergibt sich aus dem Einfluss auf Zilienschlagfrequenz, Mukus und Membran in Abhängigkeit von der Verweildauer und der Häufigkeit der Applikation der jeweiligen Substanz.

Tabelle 24: Penetration von DSCG in Rindermukosa in Abhängigkeit vom Hilfsstoffzusatz

Zusatz	Gewebe nach Inkubation				Gewebe nach Permeation	
	$c_T \times 10^{-3}$ [mg/mg]	c_T [%]	$c_{SP} \times 10^{-3}$ [mg/mg]	c_{SP} [%]	$c_T \times 10^{-3}$ [mg/mg]	c_T [%]
Referenz	$5,61 \pm 0,86$	0,28	$11,31 \pm 2,83$	0,57	$1,04 \pm 0,17$	0,055
+ BAC/EDTA	$5,08 \pm 0,85$	0,25	$16,66 \pm 3,56$	0,83	$2,30 \pm 0,28$	0,115
+ EDTA	$5,35 \pm 0,92$	0,27	$13,09 \pm 3,30$	0,65	$1,84 \pm 0,25$	0,092
+ BAC	$4,83 \pm 0,79$	0,24	$8,16 \pm 0,86$	0,41	$3,05 \pm 0,35$	0,153*

c_T Gewebespiegel

c_{SP} Konzentration in der Spülflüssigkeit

* signifikant verschieden von Referenz (*t*-Test)

Tendenziell lassen die freigesetzten Proteinmengen (Tab. 25) einen Zusammenhang zwischen Enhancerfunktion des EDTA und der Erhöhung des P_{app} von DSCG erkennen (↓ 4.2.2.1). Da jedoch EDTA in der hier verwendeten Konzentration entsprechend morphologischen Untersuchungen [61] die Integrität der Mukosa kaum beeinträchtigen sollte, kann anhand der gefundenen Proteinfreisetzen aus der Membran nach Kontakt mit den DSCG-haltigen Lösungen auch für DSCG selbst zumindest ein geringer Effekt auf die Integrität der Mukosa angenommen werden. Die Untersuchungen bestätigen zudem die Aussage (↓ 4.2.2.1), dass die membranschädigenden Effekte des tensidischen BAC durch das gebildete Ionenpaar mit DSCG nicht zum Tragen kommen. Gleichzeitig werfen sie jedoch die Frage auf, ob BAC in der Kombination mit DSCG noch ausreichend konservierend wirkt.

Tabelle 25: Proteingehalte [mg] in den „Penetrationsflüssigkeiten“ (10^{-2} mg je mg Membran- (Trockengewicht))

	Gewebe nach Inkubation		Gewebe nach Permeation	
	Schüttelflüssigkeit	Spüllösung	Donator	Akzeptor
Referenz	6,48 ± 1,15	1,43	1,94 ± 1,41	2,69
+ BAC/EDTA	13,01 ± 3,65	3,14	15,51 ± 6,34	3,09 ± 0,77
+ EDTA	13,10 ± 3,65	1,30	10,03 ± 2,46	1,12 ± 0,52
+ BAC	5,03 ± 0,91	1,43	3,44 ± 7,81	0,52 ± 0,44

4.3.2.2 Einfluss der Konzentration

Tabelle 26 dokumentiert die Ergebnisse der Untersuchungen des Konzentrationseinflusses von DSCG auf das Penetrationsverhalten.

Tabelle 26: Penetration von DSCG in Rindernasenschleimhaut in Abhängigkeit von seiner Konzentration

Konz.	Gewebe nach Inkubation				Gewebe nach Permeation	
	$c_T \times 10^{-3}$	c_T	$c_{SP} \times 10^{-3}$	c_{SP}	$c_T \times 10^{-3}$	c_T
[mg/ml]	[mg/mg]	[%]	[mg/mg]	[%]	[mg/mg]	[%]
Referenz	5,61 ± 0,86	0,28	11,31 ± 2,83	0,57	1,04 ± 0,17	0,055
6	15,05 ± 1,90	0,25	29,92 ± 4,12	0,50	13,19 ± 3,52	0,220
10	19,20 ± 2,14	0,19*	56,95 ± 9,62	0,57	4,92 ± 0,98	0,049
20	33,75 ± 5,83	0,17*	109,23 ± 17,19	0,55	10,79 ± 1,62	0,054

c_T Gewebespiegel

c_{SP} Konzentration in der Spüllösigkeit

* signifikant verschieden von Referenz (t -Test)

Auch bei der Betrachtung des Konzentrationseinflusses von DSCG kann **zwischen den Gewebespiegeln nach erfolgter Permeation** und den für die Permeation erhaltenen P_{app} (Tab. 17) ein Zusammenhang gesehen werden, in dem Sinne, dass mit abnehmender Permeabilität der Rindermukosa (P_{app} sinkt) die Gewebespiegel (c_T) steigen. Besonders markant ist dabei das Penetrationsverhalten von DSCG aus der Lösung mit einer Konzentration von 6 mg/ml. Der hohe Gewebespiegel von DSCG ($c_{T\ 6\ \text{mg/ml}} = 13,19 \times 10^{-3}$ mg/mg) und der verglichen mit der Referenz erniedrigte P_{app} ($P_{app\ 6\ \text{mg/ml}} = 1,11 \times 10^{-5}$ cm/s) (Tab. 17) bestätigen die Vermutung, die für den „Membraneffekt“ der Substanz postuliert wurde (↓ 4.2.2.1). Die Wechselwirkung

mit den Komponenten der Mukosa (membranständige Mukusglykoproteine) scheint für diesen Konzentrationsbereich zu dominieren, die Gewebespiegel sind erhöht.

Eine Konzentration von 6 mg/ml entspricht ungefähr derjenigen, die nach der Applikation durch die Verdünnung mit nasalem Sekret aus den üblicherweise 20 mg/ml enthaltenden FAM resultiert.

Die Ergebnisse des **Inkubationsversuches** zeigen dagegen, dass die assoziierten DSCG--Moleküle ($c > 10$ mg/ml) durch ihre Größe in ihrer Penetrationsfähigkeit eingeschränkt sind.

In Tabelle 27 sind die Ergebnisse der Proteinbestimmungen für diese Penetrationsversuche angegeben.

Insbesondere bei Betrachtung der im Rahmen der Permeationsversuche freigesetzten Proteinmengen kann für steigende DSCG-Konzentrationen eine verstärkte Freisetzung von Proteinen festgestellt werden. Ein konzentrationsabhängiger Membraneffekt scheint wiederum möglich.

Tabelle 27: Proteingehalte [mg] in den „Penetrationsflüssigkeiten“ je mg Membran (Trockengewicht) in Abhängigkeit von der DSCG-Konzentration

Konz. [mg/ml]	Gewebe nach Inkubation		Gewebe nach Permeation	
	Schüttelflüssigkeit	Spüllösung	Donator	Akzeptor
Referenz	$6,48 \pm 1,15$	1,43	$1,94 \pm 1,41$	2,69
6	$12,8 \pm 5,55$	$3,34 \pm 0,82$	$6,80 \pm 2,29$	2,26
10	$7,66 \pm 1,91$	$3,78 \pm 1,43$	$4,05 \pm 3,58$	$4,02 \pm 1,25$
20	$7,63 \pm 6,64$	$6,72 \pm 1,55$	$6,44 \pm 1,27$	$4,86 \pm 3,04$

Dabei können die Proteine sowohl durch die mögliche Interaktion von DSCG mit den Komponenten der Membran selbst als auch mit deren Mukusglykoproteinen freigesetzt werden. Für Chitosane konnte im Perfusionsmodell nachgewiesen werden, dass deren Komplexe mit dem Mukus durch die Wechselwirkung verstärkt ausgewaschen werden, wobei beim Auswaschprozess die Kettenlänge der Chitosane deutlich Einfluss nahm [166]. So könnte die vergleichsweise hohe Proteinfreisetzung bei einer Konzentration von 6 mg/ml auf eine besonders ausgeprägte Mucinwechselwirkung schließen lassen und gleichzeitig den erhöhten Gewebespiegel erklären.

4.3.3 Rheologische Untersuchungen – Mucinwechselwirkungen

4.3.3.1 Rheologie – Theoretische Grundlagen

Die Rheologie ist die Wissenschaft von der Deformation und vom Fließen der Stoffe unter der Einwirkung äußerer Kräfte. Als Deformation bezeichnet man die relative Verschiebung der Volumenelemente eines Körpers, bei der sein Zusammenhalt aber nicht zerstört wird [187].

In üblichen Rheometern werden die zu untersuchenden Substanzen einer Scherbelastung ausgesetzt. Dabei bleibt das Volumen der Probe unverändert. Die so ermittelte Viskosität ist die Scherviskosität, die für die meisten Prozesse in Technik und Naturwissenschaft relevant ist. Bei den mit dem MC 100 (↑ 5.2.5) gemessenen Viskositäten handelt es sich ausschließlich um Scherviskositäten [188].

A Rheologische Größen

Zur Definition der Größen Schubspannung τ , Scherung γ und Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ sei ein Volumenelement zwischen zwei parallelen Platten betrachtet (Kartenblattmodell, Abb. 25). Die eine Platte sei fest eingespannt, die andere werde durch eine Tangentialkraft F_T [N] belastet. Wirken sonst keine Kräfte, entsteht über dem Volumenelement mit der Berührungsfläche A [m²] über die Höhe h [m] des Plattenabstandes eine konstante Schubspannung τ [Pa] (Gl. 2).

$$\tau = \frac{F_T}{A} \quad (\text{Gl. 2})$$

Die Schubspannung bewirkt eine Verformung des Volumenelementes. Man bezeichnet die Größe γ (Gl. 3) als Deformation oder Scherung.

$$\gamma = \frac{dx}{dy} = \tan \alpha \quad (\text{Gl. 3})$$

Für Flüssigkeiten nimmt die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeitselemente linear mit der Höhe h zu. Ganz allgemein bezeichnet man den Gradienten der Strömungsgeschwindigkeit als Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ oder D [1/s]. In diesem Fall gilt für $\dot{\gamma}$ in y-Richtung Gleichung 4, wobei v_{Platte} die Geschwindigkeit der oberen Platte darstellt.

$$\dot{\gamma} = \frac{dv_x}{dy} = \frac{v_{\text{Platte}}}{h} = \text{konst.} \quad (\text{Gl. 4})$$

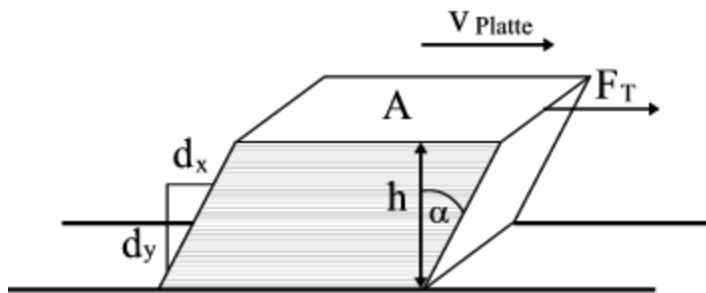


Abbildung 25: Kartenblattmodell; modifiziert nach [187]

Die Schubspannung τ ist mit der Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ verknüpft. Es gilt

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Gl. 5})$$

mit $\eta = \nu \cdot \rho$ als dynamischer Viskosität [Pas], ν als kinematischer Viskosität [m^2/s] und ρ als Dichte [g/cm^3] [187].

B Rheologische Körper

Die Rheologie beschreibt, wie sich ein Körper¹ bei Beanspruchung durch äußere Kräfte verformt. Sie bewegt sich zwischen den beiden Extremen: idealer Festkörper und ideale Flüssigkeit [78].

Ideale Festkörper verhalten sich rein elastisch, d. h. die Energie der Deformation kann vollständig zurückgewonnen werden. Wenn der Körper entlastet wird, kehrt er sofort wieder in den ursprünglichen Zustand zurück. Ideale Flüssigkeiten und Gase hingegen werden durch äußere Kräfte irreversibel verformt. Die Deformationsenergie wird dabei in Wärme umgewandelt und kann somit nicht zurückgewonnen werden.

Reale Körper sind weder ideale Festkörper noch ideale Fluide. Selbst ein realer Festkörper kann unter Anwendung genügend großer Kräfte irreversibel verformt werden. Reale Körper, deren rheologisches Verhalten zwischen dem von idealen Flüssigkeiten und Festkörpern eingestuft werden muss, weisen alle drei rheologischen Grundeigenschaften auf: Plastizität, Viskosität und Elastizität. Weist ein Körper gleichzeitig sowohl elastische als auch viskose Deformationsanteile auf, wird er als **viskoelastisch** bezeichnet. Die Verformung eines viskoelastischen Festkörpers stellt sich nach der Entlastung nahezu vollständig zurück, die der viskoelastischen Flüssigkeit nur um den elastischen Anteil.

¹ Körper können in diesem Zusammenhang Festkörper, Flüssigkeiten und Gase sein.

Für ideale Flüssigkeiten (**Newton-Systeme**) ist die Viskosität eine Stoffkonstante und lediglich eine Funktion von Temperatur und Druck, nicht aber von Höhe und Dauer der äußeren Belastung. Bei den Nicht-Newton-Körpern ist die Viskosität zusätzlich abhängig von der einwirkenden äußeren Kraft. Nicht-Newton-Körper werden **strukturviskos** genannt, wenn mit zunehmender Belastung eine Abnahme der Viskosität zu beobachten ist. Die Charakterisierung solcher Systeme erfolgt durch die Aufzeichnung vieler Messwerte über einen Deformationsbereich.

Strukturviskose Substanzen, die unter einwirkender Scherbelastung eine Viskositätserniedrigung erfahren, werden als pseudoplastische Systeme bezeichnet. Beginnen strukturviskose Fließkörper erst durch das Einwirken einer bestimmten Scherkraft zu fließen, d. h. es liegt eine Fließgrenze¹ vor, wird der rheologische Körper **plastisch** genannt. Unterhalb ihrer Fließgrenze verhalten sich solche Systeme wie elastische Festkörper, oberhalb werden sie irreversibel verformt.

Besitzen strukturviskose Systeme neben der Belastungsabhängigkeit der Viskosität zusätzlich eine Zeitabhängigkeit, zeigen sie den Effekt der Thixotropie. **Thixotrope** Körper sind solche Systeme, die unter mechanischer Krafteinwirkung einer vollständig reversiblen Fließverflüssigung unterliegen.

Die Rheologie bietet die Möglichkeit, strukturelle Veränderungen (Vernetzungsgrad), insbesondere von Polymeren, anhand ihres rheologischen Verhaltens zu erfassen und vor allem zu charakterisieren [78, 187, 189, 190, 191].

C Rotationsrheologie

Rotationsuntersuchungen haben zum Ziel, das Verhalten eines Körpers unter einer Belastung zu untersuchen. Dabei wird der ursprüngliche Zustand der physikalischen Wechselwirkungen gestört. Das Fließverhalten wird im Rotationsmodus durch das Rotieren eines Messkörpers in der Probe erfasst. Dabei wird entweder die Schergeschwindigkeit vorgegeben und die notwendige Schubspannung gemessen oder die Schubspannung vorgegeben und die sich einstellende Schergeschwindigkeit gemessen. Es werden daher unterschieden: Versuche mit Schubspannungsvorgabe: **CS-Modus** (engl.: controlled stress) und Versuche mit Schergeschwindigkeitsvorgabe: **CR-Modus** (engl.: controlled rate) [190].

Bei Rotationsuntersuchungen kann nicht nur die Veränderung der Viskosität einer Messprobe mit zunehmender Belastung ermittelt werden, sondern auch ihre zeitliche Viskositätsänderung, d. h. ihr thixotropes Verhalten. Die Belastungsabhängigkeit wird durch eine

¹ Die Fließgrenze charakterisiert diejenige Kraft, die nötig ist, um bei einer Testsubstanz, die einem Festkörper ähnelt, die anfänglich elastische Verformung der Volumenelemente gegen eine raummäßige Veränderung ihrer Volumenteile zu ersetzen.

Aufwärtsrampe (Aufkurve) der Vorgabegröße ermittelt, die Zeitabhängigkeit durch eine anschließende Abwärtsrampe (Abkurve). Zusammen bilden sie die aufgenommene Fließkurve eines Systems. Versuche mit Vorgabe von Schergeschwindigkeitsrampen erlauben den Vergleich von Fließkurven von Nicht-Newton-Systemen.

D Oszillationsrheologie

Im Oszillationsversuch wird die Probe harmonisch (sinusförmig im Zeitablauf) belastet: mit konstanter Frequenz wird entweder die Schubspannung harmonisch vorgegeben und die phasenverschobene harmonische Deformationsantwort gemessen oder die Deformation harmonisch vorgegeben und die dafür notwendige harmonische Schubspannung und deren Phasenverschiebung werden gemessen [189].

Dabei besteht wiederum die Möglichkeit, im CS-Modus die Schubspannungsamplitude τ_0 vorzugeben und die zugehörige Deformationsamplitude γ_0 zu erfassen oder im CR-Modus genau umgekehrt zu verfahren. Im Unterschied zur Rotationsmessung werden im Oszillationsversuch aber stets zwei Größen vorgegeben und zwei Größen erfasst. Die zweite Vorgabegröße ist die Kreisfrequenz ω [1/s] und die zweite Messgröße die Phasenverschiebung δ [°] (Abb. 26) [188].

Aus den Vorgabe- und Messgrößen (γ_0 , τ_0 , ω , δ) werden folgende rheologische Größen berechnet:

$$\text{Speichermodul } G' \text{ [Pa]:} \quad G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos \delta \quad (\text{Gl. 6})$$

$$\text{Verlustmodul } G'' \text{ [Pa]:} \quad G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \sin \delta \quad (\text{Gl. 7})$$

$$\text{Verlustfaktor } \tan \delta [1]: \quad \tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (\text{Gl. 8})$$

$$\text{Betrag der Komplexen Viskosität } |\eta^*| \text{ [Pas]:} \quad |\eta^*| = \frac{1}{\omega} \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (\text{Gl. 9})$$

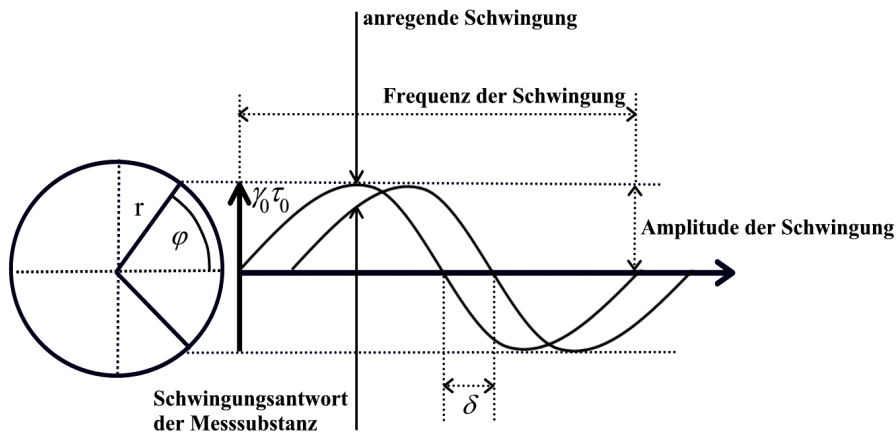


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Größen im Oszillationsversuch; modifiziert nach [191]

Der Speichermodul G' (Gl. 6) charakterisiert das elastische Verhalten einer Substanz und stellt ein Maß für die reversible und rückgewinnbare Deformationsenergie dar. Der Verlustmodul G'' (Gl. 7) hingegen beschreibt das viskose Verhalten der Testsubstanz. Sein Wert entspricht der irreversibel an die Umgebung abgegebenen und damit verlorenen Energie. Der Verlustfaktor $\tan \delta$ (Gl. 8) beschreibt das Verhältnis zwischen elastischem und viskosem Anteil. Der Betrag der komplexen Viskosität $|\eta^*|$ beinhaltet sowohl elastische als auch viskose Eigenschaften der Messsubstanz [188, 190].

Um reproduzierbare Substanzparameter zu erhalten, darf die molekulare Struktur der Probe nicht zerstört werden. Darum wird die Probe im Oszillationsversuch nur innerhalb ihres linear-viskoelastischen Bereiches (LVB) belastet, für den gilt: $\gamma_0 \sim \tau_0$.

Der LVB wird im CS-Modus durch Vorgabe einer konstanten Frequenz und größer werdender Schubspannungsamplitude, im **Amplitudensweep**, bestimmt. Aus dem bei verschiedenen Frequenzen des Amplitudensweeps ermittelten LVB ergibt sich der Messbereich des **Frequenzsweeps**, bei dem nun im CS-Modus eine größer werdende Frequenz bei konstanter Schubspannung vorgegeben wird [191].

E Rheologische Auswertemodelle

Ostwald-, Herschel-Bulkley-Fit

Die vergleichende Betrachtung des Fließverhaltens strukturviskoser Körper ohne nennenswerte Thixotropie wird durch eine Kurvenanpassung möglich. Die Anpassung erfolgt unter der Annahme, dass die Viskosität der Zubereitung mit steigender Belastung abnimmt.

Die Auswertung nach Ostwald (Gl. 10) ist für strukturviskose Systeme mit pseudoplastischem Fließverhalten geeignet:

$$\tau = m \cdot D^p \quad (Gl. 10)$$

m	Ostwald-Konsistenz [Pa s^p]
p	Ostwald-Fließindex [1]
D	Schergeschwindigkeit [$1/\text{s}$]

Für strukturviskose Systeme mit Fließgrenze erfolgt die Anpassung nach Herschel-Bulkley (Gl. 11) [188, 190, 192]:

$$\tau = \tau_H + K \cdot D^p \quad (Gl. 11)$$

τ_H	Fließgrenze (τ_0) [Pa]
K	Herschel-Bulkley-Konsistenz [Pa s]
p	Herschel-Bulkley-Index [1]
D	Schergeschwindigkeit [$1/\text{s}$]

Dabei gilt für beide Methoden:

- | | |
|-----|---|
| p | Maß für die Strukturviskosität, d. h. die Krümmung der Kurve
(idealviskos: $p = 1$, strukturviskos: $p < 1$)
Wert der Schubspannung τ [Pa] bei $D = 1 \text{ 1/s}$ und somit identisch mit dem |
| m | Zahlenwert der Viskosität η [Pa s] bei 1 1/s ($\eta = \tau / D$), Maß für die Konsistenz der Zubereitung |
| K | Maß für die Konsistenz der Zubereitung |

Zeitkonstante

Bei hinreichend kleinen Schergeschwindigkeiten kann auch für ein strukturviskoses System eine konstante Anfangsviskosität, die Nullviskosität, gemessen werden. Genauso kann bei sehr großen Belastungen für solche Systeme eine konstante Endviskosität erfasst werden. Dieses belastungsabhängige Verhalten wird z. B. durch das Cross- oder Carreau-Modell beschrieben. Bei der Aufnahme von Fließkurven mittels Schergeschwindigkeitsrampen soll die Belastungsabhängigkeit der Viskosität ermittelt werden. Besitzt die Substanz aber auch ein zeitabhängiges Fließverhalten, enthält die Fließkurve sowohl Informationen über die Belastungs- als auch die Zeitabhängigkeit. Eine Aufteilung in die beiden Anteile ist nicht möglich.

Werden dagegen zwei Fließkurven unmittelbar nacheinander gemessen, ist eine Aufteilung möglich, weil dann zu jeder Schergeschwindigkeit zwei Viskositäten zu unterschiedlichen Zeiten vorliegen. Mit einem einfachen Exponentialgesetz lassen sich die Startviskosität (Extrapolation der Zeit gegen 0) und eine Zeitkonstante berechnen. Die Zeitkonstante ist ein grobes Maß für die Dauer, die bis zum Erreichen der (unbekannten) Endviskosität benötigt würde. Diese Auswertung soll helfen, eine Aussage darüber zu treffen, welche Abhängigkeit biologisch signifikant ist: die zeitliche oder die belastungsabhängige [188].

4.3.3.2 Untersuchungen

Die nachfolgenden Untersuchungen erfassen den Einfluss von DSCG und/oder der Polymere Natriumhyaluronat (HA) und Methylcellulose¹ (MC) auf die rheologischen Parameter einer Mucindispersion (M). Dabei werden das Fließverhalten und das oszillationsrheologische Verhalten der biomakromolekularen Dispersion und der Polymere untersucht. Die Erfassung des Freigabeverhaltens von DSCG mit und ohne Polymerzusatz runden die Wechselwirkungsstudien ab.

Ziel der Untersuchungen waren die Charakterisierung des bereits in 4.2.1 festgestellten Effektes von DSCG auf die rheologischen Parameter der Mucindispersion sowie der Vergleich bzw. die Kombination mit den mukoadhäsiven Polymeren HA und MC. Die Polymerformulierungen sollten der Entwicklung einer geeigneten viskositätserhöhten und mukoadhäsiven Zubereitung zur nasalen Applikation für die nachfolgenden In-vivo-Verfügbarkeitsstudien am Kaninchen (↑ 4.3.4) dienen sowie generell in Richtung eines optimierten DSCG-Präparates zielen.

Aus der Herstellung des Probenansatzes mit den jeweiligen Zubereitungen resultierte für die im Weiteren als Mucin (M) bezeichnete Dispersion eine Konzentration von 15 % (m/m). Die Polymere lagen in den Probenmischungen in einer Konzentration von 0,25 % (HA) bzw. 0,68 % (MC) (m/m) vor. Die in den Abbildungen und Tabellen durch einen Schrägstrich nachgestellten Mengenangaben [mg] für DSCG (z. B. DSCG/5) beziehen sich auf Gramm Probengemisch. Die Verdünnung der Zubereitung während des Probenansatzes jeweils um den Faktor 4 entspricht in etwa der physiologisch auftretenden Verdünnung durch das nasale Sekret [160].

4.3.3.3 Rheologie – Mucinwechselwirkungen

A Rotationsrheologie

Die gewählten Deformationsgeschwindigkeiten beziehen sich auf das Geschwindigkeitsgefälle, das sich über die mittlere Höhe der gesamten Mukusschicht (7,5 bis 15 µm) der Nasenschleimhaut ergibt ($D = 0$ bis 10 1/s) oder über die mittlere Höhe der oberen, viskosen Schicht (0,5 bis 5 µm) ($D = 10$ bis 100 1/s) [16, 68] und der Geschwindigkeit des rachenwärts gerichteten Transportes (5 bis 6 mm/min) durch die Zilientätigkeit. Die Dauer der Scherbeanspruchung wurde der Verweildauer nasal applizierter Substanzen unter physiologischen Bedingungen angepasst (20 min) [22].

¹ Methylcellulose ist eine partiell methylierte Cellulose (Ph. Eur. 2002). Eine 2%ige wässrige Zubereitung besitzt eine Viskosität von 3000 ... 5000 mPas.

Abbildung 27 zeigt die Rheogramme¹ der Mucindispersion nach Zusatz von DSCG und/oder HA in Abhängigkeit von der Natriumcromoglicatkonzentration über den Schergeschwindigkeitsbereich von $D = 10$ bis 100 1/s . Tabelle 28 listet die aus den Aufkurven nach Ostwald-Fit² gewonnenen rheologischen Kenngrößen ($\eta_{D=1}$ und p) sowie die Thixotropieflächen der Fließkurven auf.

Mucin zeigt im Rheogramm das Verhalten eines strukturviskosen, pseudoplastischen Körpers mit nur geringen thixotropen Eigenschaften, d. h. zusätzliche sekundäre chemische Bindungen zwischen den verknäulten Molekülketten spielen lediglich eine untergeordnete Rolle. Die Strukturviskosität dominiert eindeutig die Thixotropie bzw. die Belastungsabhängigkeit die Zeitabhängigkeit. Daher ist die Zeitkonstante, d. h. die Zeit in Sekunden, die die Viskosität zum Erreichen eines stationären Zustandes bei Belastung benötigt, mit einer Größenordnung von 10^5 bis 10^6 s sehr hoch (Daten nicht dargestellt) [188]. Damit besitzt die Modelldispersion die Fließcharakteristika des nasalen Mukus [68]. Mit zunehmender Belastung (Husten, Niesen) nimmt die Viskosität durch eine Orientierung und Entschlaufung der Makromoleküle ab. Die Dauer der Belastung spielt dabei keine Rolle. Eine Rückstellung auf die für den optimalen Transport nötige Viskosität ist gewährleistet.

Der Zusatz von DSCG zu Mucin bewirkt eine konzentrationsabhängige Zunahme der Strukturviskosität ($p_{M/DSCG} < p_M$), die sich in einer höheren Viskosität $\eta_{D=1}$ äußert. Da zugleich die AUCs der Fließkurven, die **Hysteresisflächen** (ein hier relatives Maß für die Thixotropie, also für die Arbeit, die notwendig ist, um eine dreidimensionale Struktur zu zerstören [189]), mit der DSCG-Konzentration zunehmen, lässt sich schlussfolgern, dass zusätzliche sekundäre Bindungen entstehen. DSCG zeigt somit deutlich „adhäsive“ Fähigkeiten.

Natriumcromoglicat ist negativ geladen und besitzt durch seine Carboxyl- und Hydroxylgruppen die Möglichkeit zu Wasserstoffbrückenbindungen. Folgende Ursachen für die Zunahme der Strukturviskosität durch den DSCG-Zusatz wären denkbar:

- DSCG ist an den entstehenden sekundären Bindungen zwischen oder innerhalb der Mucinmolekülketten selbst beteiligt.
- DSCG verbessert im Sinne einer Hydrotropierung die Solvation der Makromoleküle und verstärkt somit gleichzeitig die inter- und/oder intramolekularen Wechselwirkungen der Mucinmoleküle; die verknäulte makromolekulare Struktur faltet sich auseinander.

¹ Auf die Darstellung der Fehlerindikatoren in den Fließkurven wurde verzichtet, um die Übersichtlichkeit zu wahren. Prinzipiell lagen die Streuungen der Einzelwerte um $2 \pm 0,25 \%$.

² Eine makroskopisch wahrnehmbare Fließgrenze unter dem Einfluss der Schwerkraft in den Probengefäßen konnte experimentell nicht gefunden werden. Deswegen wurde die Auswertung der Fließkurven nach Ostwald vorgenommen.

Je stärker die Entfaltung der Mucinmolekülketten bzw. die entstehende dreidimensionale Netzwerkstruktur ausgeprägt ist, umso stärker wird aber auch gleichzeitig die Beweglichkeit der Moleküle eingeschränkt; die Scherviskosität steigt [174].

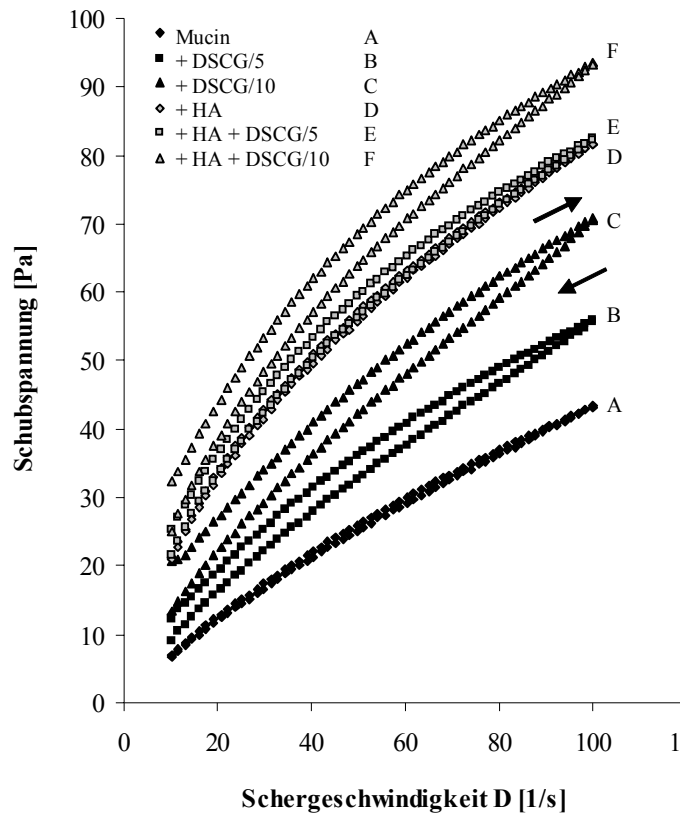


Abbildung 27: Fließkurven von Mucin mit Zusatz von DSCG (5, 10 mg/g) und/oder HA im Bereich von $D = 10$ bis 100 [1/s]

Tabelle 28: Rheologische Daten der Fließkurven aus Abb. 27

Kurve	Kurve
Hysteresis Fließkurve [Pa/s]	
A	54,65
B	269,85
C	352,23
D	80,1
E	219,67
F	360,48
Ostwald-Fließindex p	
A	0,787
B	0,662
C	0,585
D	0,567
E	0,515
F	0,475
Viskosität $\eta_{D=1}$ [Pas]	
A	1,20
B	2,63
C	4,78
D	6,14
E	7,83
F	10,62

Der Zusatz von HA zum Mucin bewirkt eine deutliche Zunahme der Strukturviskosität. Die Viskosität des Gemisches aus beiden Polymeren als „Widerstand gegen das Fließen“ steigt. Die schwach thixotropen Eigenschaften der Mucindispersion nehmen durch den Zusatz von HA dagegen nicht in nennenswertem Maße zu (Tab. 28). Sekundäre chemische Bindungskräfte zwischen oder innerhalb der Molekülketten der beiden Makromoleküle, d. h. die Entstehung zusätzlicher dreidimensionaler Netzwerkkomponenten, spielen daher bei der Zunahme der Strukturviskosität keine Rolle. Sie ist somit hauptsächlich durch eine mechanische Verschlaufung der Ketten beider Makromoleküle (Interpenetration) bedingt.

HA in PBS pH 6,0 (0,25 % (m/m)) ist in guter Näherung ein Newton-System ($p \approx 1$) mit einer Viskosität $\eta_{D=1}$ von ca. 19 mPas [193]. HA zeigt somit durch die starke Viskositätszunahme in Kombination mit der Mucindispersion deutlich mukoadhäsive Eigenschaften [194].

Der Zusatz der Kombination von HA und DSCG führt zu einer markanten Zunahme der Strukturviskosität der Mucindispersion ($p_{M/DSCG/HA} < p_{M/DSCG} < p_M$), dabei treten gleichzeitig deutliche thixotrope Effekte auf. Die in Hinblick auf eine angestrebte Zubereitung mit längerer Verweildauer „positiven“ mukoadhäsiven Eigenschaften der Einzelkomponenten HA und DSCG scheinen sich nahezu zu addieren ($\eta_{D=1\text{ M/DSCG/HA}} \approx \eta_{D=1\text{ M/DSCG}} + \eta_{D=1\text{ M/HA}}$).

Abbildung 28 zeigt die Rheogramme, die über einen sehr kleinen Schergeschwindigkeitsbereich aufgenommen wurden.

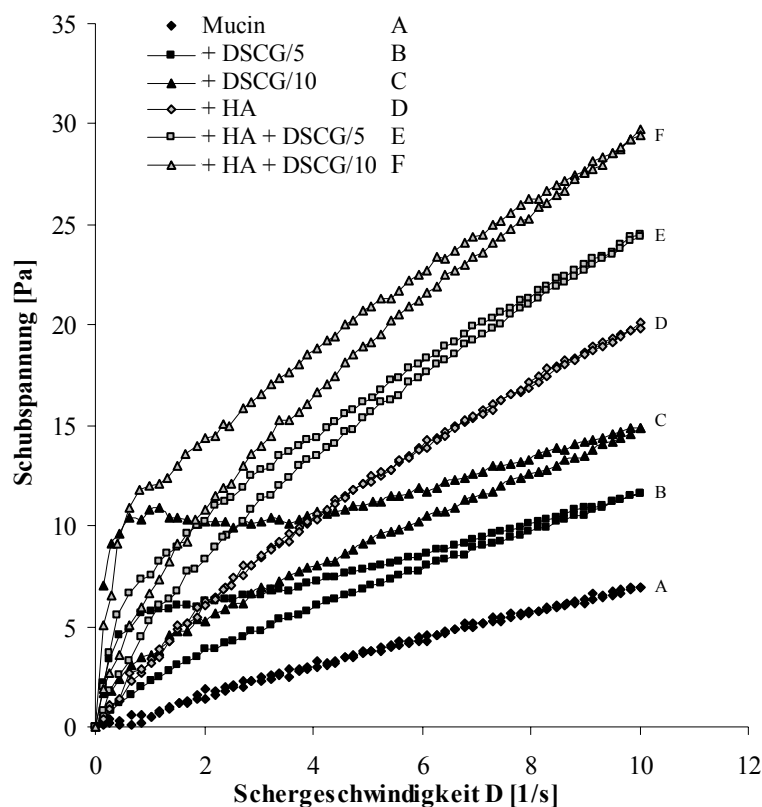


Abbildung 28: Fließkurven von Mucin mit Zusatz von DSCG (5, 10 mg/g) und /oder HA im Bereich von $D = 0$ bis 10 [1/s]

Tabelle 29: Hysteresisflächen der Fließkurven aus Abb. 28

Hysteresis _{Fließkurve} [Pa/s]	
A	0,17
B	12,76
C	26,7
D	0,49
E	10,81
F	20,14

Es sind wiederum die bereits erläuterten rheologischen Effekte festzustellen. Darüber hinaus ist im Bereich sehr kleiner Scherraten ($D < 1$ 1/s) im Rheogramm der DSCG-haltigen Proben (Abb. 28, B, C und E, F) die Tendenz einer Fließgrenze zu erkennen. Das heißt, dass im Ruhezustand ein inter- und/oder intramolekulares Netz von sekundären Bindungskräften aufgebaut wird, das dem System Feststoffcharakter verleiht. Zum Auslösen des Fließvorganges ist daher eine Mindestkraft erforderlich. Das Auftreten einer Fließgrenze kann somit auch als Maß für den Assoziationsgrad in der Probe interpretiert werden. Da jedoch kleine äußere Kräfte genügen, um die entstandenen Assoziationen zu zerstören, scheinen lediglich sekundäre chemische Bindungskräfte beteiligt zu sein. Bei der vergleichenden Betrachtung der Hysteresisflächen der Fließkurven (Tab. 28 und 29), die über die Schergeschwindigkeitsbereiche $D = 0$ bis 10 1/s (Abb. 28) und $D = 10$ bis 100 1/s (Abb. 27) aufgenommen wurden, wird das besonders deutlich. Während bei größerer Belastung (Abb. 27, Tab. 28) das Verhältnis der Hysteresisflächen von Mucin und dem Mucin/DSCG-Gemisch ungefähr 1:4 beträgt, ist im kleinen Schergeschwindigkeitsbereich die Hysteresisfläche der natriumcromoglicathaltigen Probe 70mal (Tab. 29) so groß.

Das Fließverhalten des Mucin/DSCG-Gemisches ist sogar in den Probengefäßen zu beobachten: unterhalb einer zum Auslösen des Fließvorgangs notwendigen Kraft reagiert das System elastisch auf die einwirkende Belastung. Die in der Aufwärtskurve der Probe M/DSCG/10 (Abb. 28, C) erkennbare „Nase“ im Bereich von $D = 1$ 1/s deutet auf diese elastischen Anteile in der Probe hin. Nach deren „Überfahren“ werden nur noch die viskosen Anteile der Messprobe erfasst [191].

DSCG und HA zeigen in Kombination mit der Mucindispersion deutlich „adhäsive“ (DSCG) bzw. mukoadhäsive (HA) Eigenschaften, die sich in einer Zunahme der Strukturviskosität äußern. Der Zusatz von DSCG bewirkt dabei hauptsächlich das Entstehen einer dreidimensionalen Netzwerkstruktur, d. h. einer zeitabhängigen, also thixotropen Komponente. Das tritt besonders deutlich im Bereich kleiner Schergeschwindigkeiten ($D = 0$ bis 10 1/s) hervor, also für das Geschwindigkeitsgefälle, dass sich über die obere, viskosere Mukusschicht der Nasenschleimhaut ergibt. Die Zunahme der Strukturviskosität nach Eintrag

des Polymeres HA ist auf die Verschlaufung der Molekülketten beider Makromoleküle zurückzuführen. Bei Zusatz der Kombination aus HA und DSCG zur Mucindispersion scheinen sich beide Effekte zu addieren.

Die folgenden oszillationsrheologischen Untersuchungen sollen die Art der Wechselwirkung von DSCG und HA mit der Mucindispersion charakterisieren.

B Oszillationsrheologie

Die Elastizität des nasalen Mukus ist der entscheidendste Parameter seiner rheologischen Eigenschaften für eine optimale MCC. Die Ermittlung der Viskositätswerte ohne Kennzeichnung der elastischen Eigenschaften führt zu einer unzureichenden Charakterisierung dieses Systems [68].

Ist eine Probe viskoelastisch, so wird ein Teil der Energie bei Belastung in einer elastischen Verformung der Molekularstruktur gespeichert. Die Erfassung der Viskoelastizität kann über Kriechversuche sowie über Versuche mit erzwungener Oszillation (dynamische Messung) erfolgen. Die Bestimmung der elastischen Eigenschaften ermöglicht einen Einblick in die Molekülstruktur der untersuchten Substanz [82], da es zu keiner Zerstörung der molekularen Struktur der Probe kommt. Ein weiterer Vorteil der Oszillationsmessungen liegt in der Möglichkeit, gleichzeitig die viskosen und elastischen Anteile der Messprobe zu bestimmen [78].

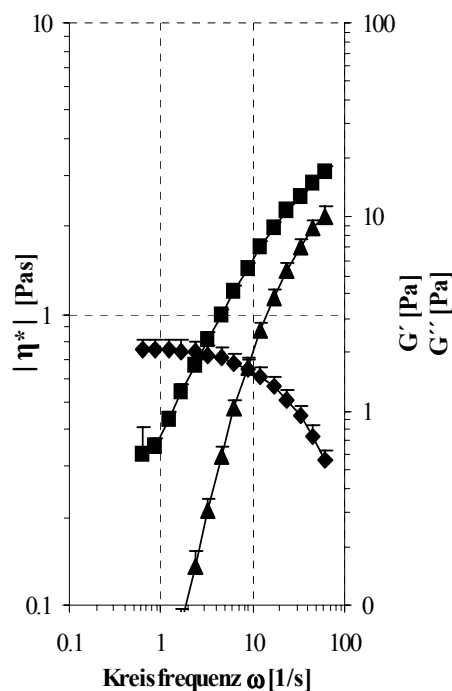


Abbildung 29: Frequenzsweep von Mucin: Speichermodul G' (▲), Verlustmodul G'' (■), Betrag der komplexen Viskosität $|\eta^*|$ (◆)

Abbildung 29 zeigt den Frequenzsweep von Mucin. Die Viskoelastizität der Modells substanz ist deutlich an dem frequenzabhängigen, elastischen (G') und viskosen Modul (G'') zu erkennen [16]. Die Probe verhält sich flüssigkeitsartig ($G' < G''$, $\tan \delta > 1$) und zeigt im Frequenzsweep das Verhalten linearer Makromoleküle mit relativ breiter Molekülmassenverteilung, deren Netzwerk hauptsächlich aus sterischen Verschlaufungen der Molekülketten und in untergeordneter Dominanz durch Quervernetzungen innerhalb des Moleküls oder zwischen den Molekülketten die Elastizität bedingt [188, 187].

Die Frequenzabhängigkeit der Moduln erklärt sich wie folgt: Bei kleinen Frequenzen haben die Moleküle viel Zeit, sich zu entwirren und gleichzeitig zu entspannen; sie fließen aneinander vorbei und reagieren hauptsächlich viskos. Mit zunehmender Frequenz reagieren die Proben zuerst innerhalb des Netzverbandes mit Widerstand gegen die Deformation und verhalten sich ähnlich wie Festkörper. Die Verbindungsglieder strecken sich elastisch. Danach beginnen sich die Molekülglieder zu entschlaufen, zu orientieren und schließlich zu fließen [189].

Abbildung 30 zeigt, dass der Zusatz von DSCG zur Mucindispersion die Kurven des Frequenzsweeps gegenüber Abbildung 29 deutlich verändert. Mit zunehmender Konzentration an DSCG ($5 \rightarrow 10$ mg/ml DSCG) erhöht sich der Betrag der komplexen Viskosität, weil sowohl der viskose Modul (G'') als auch der Speichermodul (G') zunehmen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Anteil der temporären Quervernetzungen in der Probe konzentrationsabhängig markant ansteigt. Die miteinander verschlaufenen Molekülketten des Mucins verwickeln sich durch inter- und/oder intramolekulare Wechselwirkungen zusätzlich und erhalten durch die Bildung unbeständiger, temporärer Knotenpunkte (nichtkovalent) eine deutlich netzartige Struktur. Durch die Ausprägung der Netzwerkstruktur steigen sowohl der Widerstand gegen das viskose Fließen (Behinderung der Entschlaufung im Bereich kleiner Frequenzen) als auch der Widerstand gegen die elastische Verformung (Anzahl dehnbarer Kettenglieder des dreidimensionalen Netzwerkes wird erhöht) [189]. Dabei kann im Bereich hoher Deformationen (z. B. Abb. 30, $\omega > 10$ 1/s) sogar beobachtet werden, dass das elastische Verhalten das viskose Verhalten dominiert ($G' > G''$).

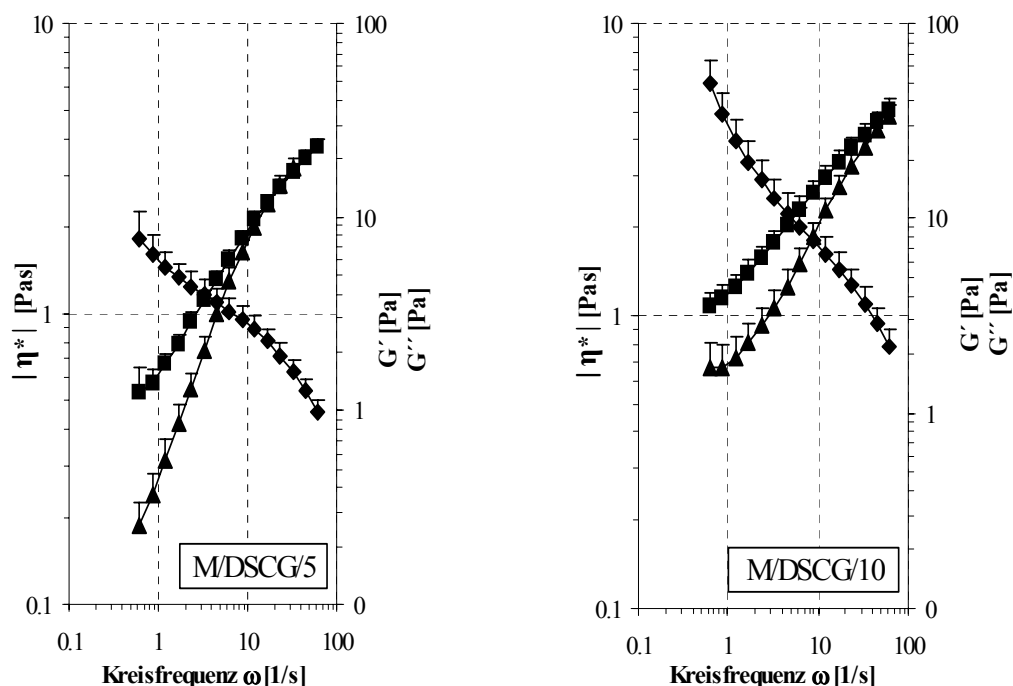


Abbildung 30: Frequenzsweeps von Mucin mit DSCG unterschiedlicher Konzentration (5, 10 mg/g): Speichermodul G' (\blacktriangle), Verlustmodul G'' (\blacksquare), Betrag der Komplexen Viskosität $|\eta^*|$ (\blacklozenge)

Abbildung 31 zeigt die Frequenzsweeps der polymerhaltigen (HA und MC) Proben. MC wurde als nichtionisches, schwach mukoadhäsives Polymer [73] zum Vergleich ausgewählt.

Der Zusatz der Polymere HA bzw. MC zum Mucin (Abb. 31) lässt im Vergleich zur DSCG-Zugabe (Abb. 30) hauptsächlich eine Zunahme der absoluten Werte erkennen. Der Verlauf der Kurven im Frequenzsweep verändert sich kaum. Daraus ist zu schlussfolgern, dass vorrangig physikalische Verschlaufungen der Makromoleküle erfolgen, die sowohl zu einer Erhöhung der Elastizität (Anzahl dehnbarer Kettenglieder wird erhöht) als auch der Viskosität (Behinderung der Entschlafung im Bereich kleiner Frequenzen) führen. Die Polymere selbst zeigen in den verwendeten Konzentrationen (0,25 % HA bzw. 0,68 % MC in PBS pH 6,0) keine viskoelastischen Eigenschaften (Daten nicht dargestellt). Ihre Eigenviskositäten sind vernachlässigbar klein.

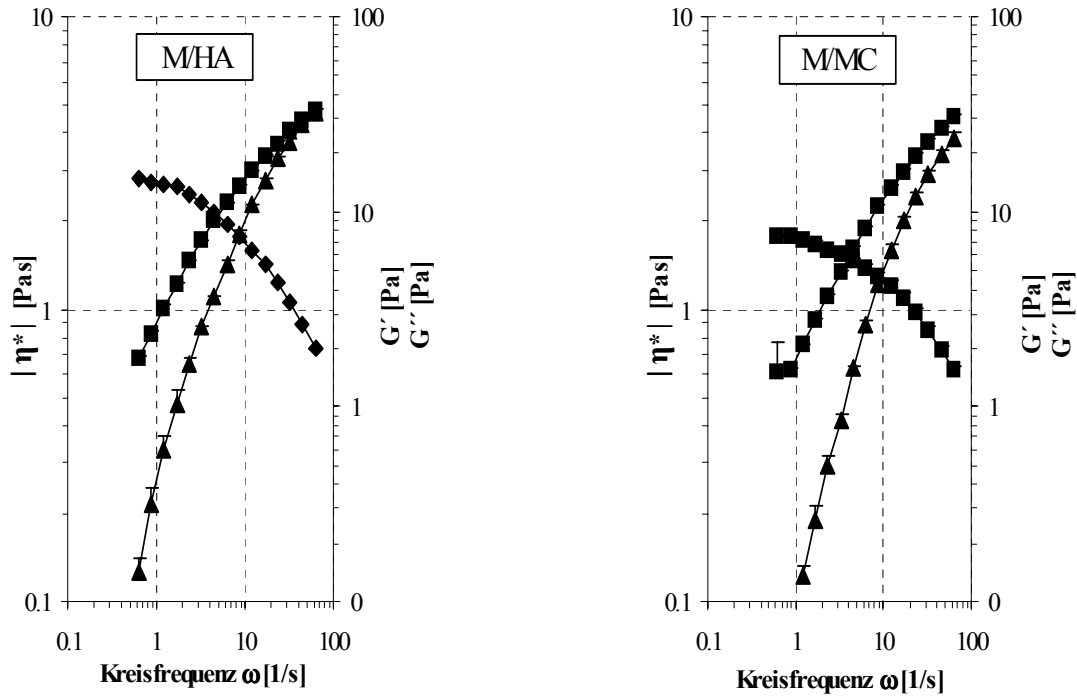


Abbildung 31: Frequenzsweeps von Mucin unter Zugabe der Polymere HA (links) und MC (rechts): Speichermodul G' (\blacktriangle), Verlustmodul G'' (\blacksquare), Betrag der Komplexen Viskosität $|\eta^*|$ (\blacklozenge)

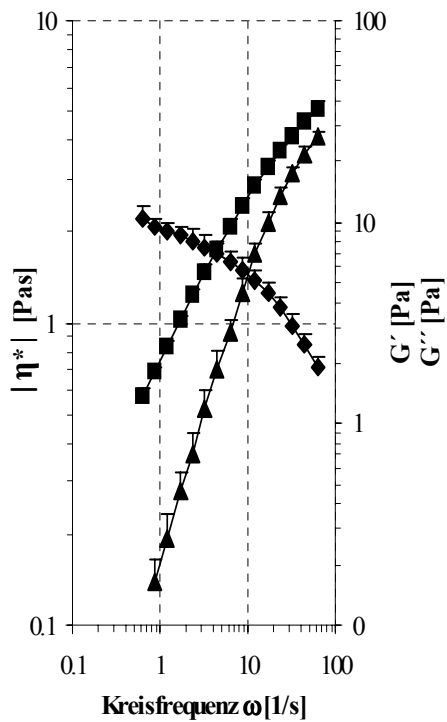


Abbildung 32: Frequenzsweeps von Mucin unter Zugabe von MC und DSCG (5 mg/g): Speichermodul G' (\blacktriangle), Verlustmodul G'' (\blacksquare), Betrag der Komplexen Viskosität $|\eta^*|$ (\blacklozenge)

In Abbildung 32 und 33 sind die Frequenzsweeps von Mucin mit einem Zusatz aus der Kombination MC (Abb. 32) bzw. HA (Abb. 33) mit DSCG dargestellt. Die für die Einzelkomponenten gefundenen Effekte spiegeln sich in den Frequenzsweeps der Kombinationen wider.

Die Kombination M/HA/DSCG (Abb. 33) unterscheidet sich in den Kurven der Frequenzsweeps deutlich von der Kombination M/MC/DSCG. Während im Bereich niedriger Frequenzen der viskose Modul von Mucin im Gemisch mit HA und DSCG überwiegt, dominiert im Bereich hoher Frequenzen wiederum das elastische das viskose Verhalten. Die Zubereitung verhält sich bei hohen Frequenzen festkörperartig ($\tan \delta < 1$) [190].

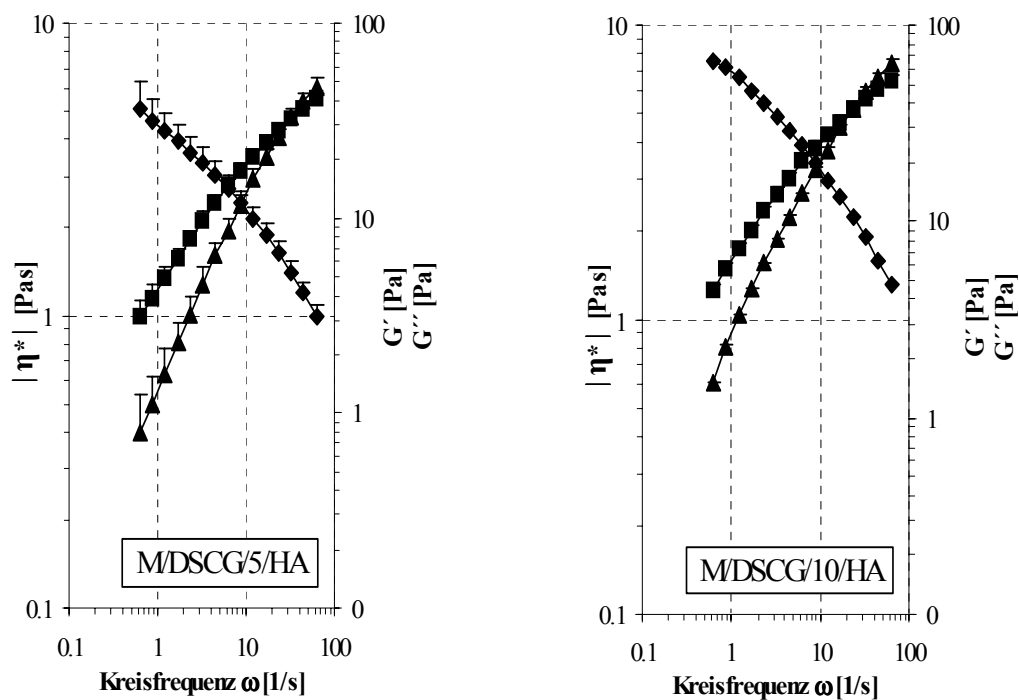


Abbildung 33: Frequenzsweeps von Mucin unter Zugabe von HA/DSCG/5 (links) und HA/DSCG/10 (rechts): Speichermodul G' (\blacktriangle), Verlustmodul G'' (\blacksquare), Betrag der Komplexen Viskosität $|\eta^*|$ (\blacklozenge)

Tabelle 30 stellt die Ergebnisse der oszillationsrheologischen Untersuchungen aller Proben (Abb. 29 bis 33) zusammen. Es sind die Steigungen (m) aus der graphischen Auftragung von „ $\log G'$ gegen $\log \omega$ (Kreisfrequenz)“ sowie die rheologischen Charakteristika der Oszillationsmessungen (G' , G'' , $\tan \delta$) dokumentiert. Die rheologischen Parameter G' , G'' , $\tan \delta$ sind den Frequenzsweeps bei einer mittleren Kreisfrequenz ($\omega = 16,9$ 1/s) entnommen [73]. Sie ermöglichen einen einfachen Vergleich.

Die Steigung m kann als Maß für die Quervernetzung der Mucinglykoproteine betrachtet werden. Sie beträgt bei rein physikalischer Verschlaufung zwei (wobei die Anpassung an die

Gerade nur im Bereich kleiner und mittlerer Frequenzen gegeben ist, siehe Korrelationskoeffizient (K) und bei einem permanenten, durchvernetzten Netzwerk (kovalente Bindungen) Null [187]. Eine abnehmende Steigung der Geraden verdeutlicht somit den Übergang zu einer Netzwerkstruktur durch temporäre Knotenpunkte, die nicht durch physikalische Verschlaufungen bedingt sind.

Der statistische Vergleich der ermittelten Daten erfolgte beispielhaft für G' . Dabei wurden sowohl die Werte für $\omega = 16,9$ 1/s als auch die Steigungen des gesamten Frequenzsweep gegeneinander verglichen (siehe Anhang 7.6).

Tabelle 30: Rheologische Kenngrößen der Frequenzsweeps (zur Statistik s. auch 7.6)

	G' [Pa]	G'' [Pa]	$\tan \delta$	m [Pa/s]	K
Mucin	4,01(0,48)	8,88 (0,35)	2,33 (0,14)	1,43 (0,164)	0,981
+ DSCG/5	6,58 (1,00)	11,86 (1,18)	1,82 (0,17)	1,12 (0,069)	0,994
+ DSCG/7,5 ¹	11,56 (2,11)*	17,34 (2,39)	1,51 (0,09)	0,87 (0,035)	0,998
+ DSCG/10	13,78 (2,11)*	19,13 (2,36)	1,40 (0,08)	0,77 (0,030)	0,998
+ MC	8,94 (0,50)*	16,07 (0,60)	1,80 (0,04)	1,31 (0,139)	0,988
+ MC + DSCG/5	9,98 (1,14)*	18,60 (1,56)	1,87 (0,05)	1,19 (0,139)	0,992
+ HA	13,83 (1,00)*	18,27 (1,57)	1,32 (0,02)	1,01 (0,090)	0,992
+ HA + DSCG/5	20,70 (2,21)*	24,27 (2,08)	1,18 (0,02)	0,87 (0,051)	0,995
+ HA + DSCG/7,5 ¹	23,95 (3,18)*	27,40 (2,40)	1,15 (0,06)	0,74 (0,044)	0,996
+ HA + DSCG/10	30,05 (1,06)*	32,00 (2,55)	1,00 (0,11)	0,76 (0,036)	0,997

¹ ohne graphische Darstellung

± SD bzw. SEM in Klammern

Werte für G' , G'' , $\tan \delta$ aller Zubereitungen signifikant vom Wert für Mucin verschieden (t -Test)

* signifikant vom Wert für M/DSCG/5

Der Zusatz aller Zubereitungen zur Mucindispersion führte zu einem signifikanten Anstieg von „Viskosität“ (G'' bei $\omega = 16,9$ 1/s) und Elastizität (G' bei $\omega = 16,9$ 1/s), wobei letztere in ausgeprägterem Maße zunahm ($\Delta G' > \Delta G''$).

Der Einfluss polymerer Zusätze zu einer Mucindispersion wurde auch durch Caramella et al. [82] und Madsen et al. [73] mit dieser Konsequenz beschrieben. Verantwortlich für das verstärkte temporäre Netzwerk durch zusätzliche Verschlaufungen und damit dehnbare Segmente ist dabei im Falle des Zusatzes von MC lediglich der Eintrag zusätzlicher Makromoleküle ($m_M \approx m_{M/MC}$, nicht signifikant (t -Test, s. 7.6)). Für HA scheint zudem das

Entstehen von Netzpunkten durch zusätzliche sekundäre Bindungen vorzuliegen ($m_M > m_{M/HA}$; signifikant (t -Test, s. 7.6)).

Das konzentrationsabhängige temporäre inter- und/oder intramolekulare Vernetzen der Mucinmoleküle durch DSCG findet in den Daten der Tabelle 30 deutlich Ausdruck ($m_M \gg m_{M/DSCG}$, signifikant (t -Test, s. 7.6)). Eine weitere Erhöhung der DSCG-Konzentration auf 12,5 mg je Gramm Probengemisch verstärkte den Effekt nicht weiter. Für eine resultierende Konzentration von 2,5 mg DSCG je Gramm Gemisch veränderten sich die rheologischen Parameter der Mucindispersion kaum (Daten nicht dargestellt).

Die folgende Abbildung 34 veranschaulicht die Zunahme der Elastizität der Mucindispersion durch den Zusatz von DSCG, HA und MC. Dargestellt sind die rheologischen Synergismen $\Delta G'$, die durch $\Delta G' = (G'_{\text{Mix}} - G'_{\text{Mucin}})$ ermittelt werden [73].

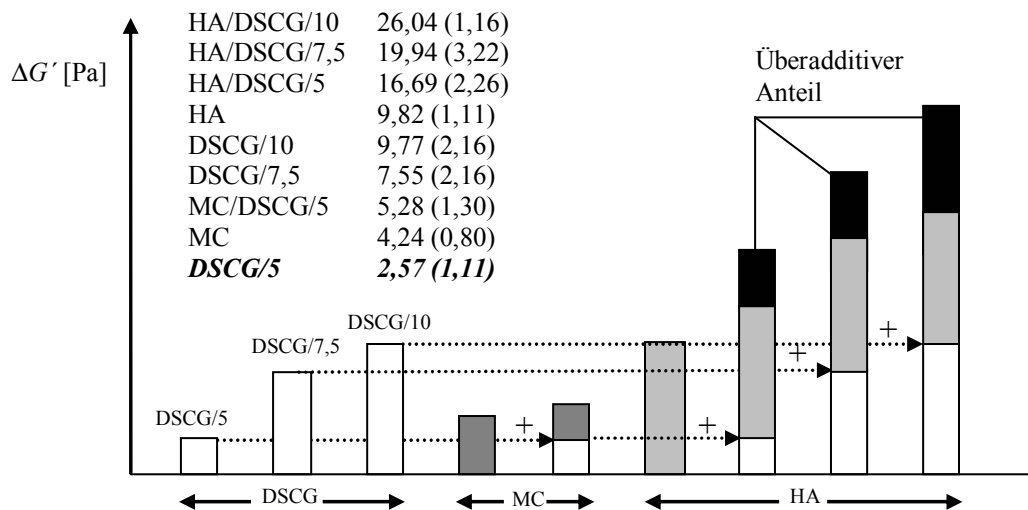


Abbildung 34: Rheologische Synergismen $\Delta G'$ [Pa]
(+) = zugefügter DSCG-Anteil zum jeweiligen Polymer

In Analogie zur Ermittlung der überadditiven Viskositätszunahme bei der Bestimmung des Mukoadhäsionsindex (\downarrow 3.3.3, \uparrow 5.2.5.2) bedeutet ein $\Delta G'$ [Pa] ein Auftreten mukoadhäsiver Wechselwirkungen [73, 87]. Die ermittelten Werte liegen für DSCG/10 im Bereich des als deutlich mukoadhäsiv beschriebenen HA [194] und übertreffen dabei signifikant (t -Test, s. 7.6) den Effekt des leicht mukoadhäsiven Polymers MC [195] in den hier verwendeten Konzentrationen. DSCG zeigt also eine ausgeprägte Wechselwirkungstendenz mit den Komponenten der Mucindispersion. Mögliche Gründe dafür wurden bereits bei der Diskussion der Fließkurven angeführt (\downarrow 4.3.3.3, A). Die Oszillationsuntersuchungen bestätigen nunmehr die Vermutung, dass zusätzliche sekundäre chemische Bindungen entstehen.

Die Kombination aus HA und DSCG führte dabei zu einer Erhöhung von $\Delta G'$ über das Maß hinaus, das der Addition der Effekte beider Komponenten entspricht. Es liegt somit ein zusätzlicher Synergismus vor (schwarze Flächen in Abb. 34). Da die aus der Darstellung „log G' gegen log ω' “ (Abb. 30 und 33) errechneten Steigungen sich nicht signifikant (t -Test, s. 7.6) verändern ($m_{M/DSCG/10} \approx m_{M/MDSCG/HA/10}$) (Tab. 30), können zusätzliche inter- und/oder intramolekulare „Vernetzungen“ der Mucinmoleküle durch sekundäre chemische Bindungen infolge des kombinierten DSCG/HA-Zusatzes nicht die Ursache für die überadditive Elastizitätszunahme sein. Vielmehr scheint die Zubereitung aus HA und DSCG die Interpenetration des Polymers HA in das Netzwerk der Mucinmoleküle zu begünstigen.

Die folgenden rheologischen Untersuchungen sollen die Zubereitung DSCG/HA charakterisieren. Die Charakterisierung der Kombination DSCG/MC soll einen Vergleich ermöglichen.

4.3.3.4 Rheologische Untersuchungen der Polymerzubereitungen

Die überadditive Komponente der rheologischen Synergismen (Abb. 34) kann sich letztlich nur durch Folgendes ergeben:

- durch Verstärkung der Interpenetration und Verschlaufung von HA mit den Mucinmolekülketten ($m_{M/DSCG/10} \approx m_{M/MDSCG/HA/10}$); vorausgesetzt der DSCG-Effekt auf die Mucindispersion bleibt in der Kombination DSCG/HA mit Mucin in vollem Umfang erhalten (Eine Möglichkeit zur Interpenetration in das Netzwerk des Mucins besteht für das nichtmakromolekulare DSCG nicht.)
- durch zusätzlich entstehende sekundäre Bindungen und damit „Quervernetzungen“ zwischen oder innerhalb der Mucinmoleküle durch das Polymer HA infolge seiner verbesserten Interpenetration in das Mucinnetzwerk; vorausgesetzt die Kombination DSCG/HA im Gemisch mit Mucin vermindert den DSCG-Effekt ($m_{M/DSCG/10} \approx m_{M/MDSCG/HA/10}$)

In beiden Fällen ist die verbesserte Interpenetration der HA-Moleküle in das Netzwerk der Mucinmoleküle eine mögliche Ursache. Demnach müsste der Zusatz von DSCG zu einem HA-Gel auch einen Einfluss auf dessen rheologisches Verhalten ausüben. Die verbesserte Fähigkeit von HA zur Interpenetration in das Mucinnetzwerk durch dessen Kombination mit DSCG sollte sich im Sinne einer besseren Hydratation (Hydrotropierung durch DSCG) in einer größeren Beweglichkeit der Polymerketten äußern, die aus den verminderten Interaktionen zwischen den oder innerhalb der einzelnen HA-Ketten resultiert. Gleichzeitig könnte dadurch die Fähigkeit von HA, mit den Mucinmolekülen zu wechselwirken, verbessert werden. Da die größere Beweglichkeit der HA-Ketten in der Kombination mit DSCG zur einer Auffaltung der makromolekularen Struktur der HA-Moleküle führt, sollte für das Gemisch DSCG/HA eine Erhöhung der dynamischen Viskosität feststellbar sein.

Da eine 0,25%ige Lösung von HA – wie in den bisherigen Versuchen verwendet – keine detektierbaren viskoelastischen Anteile besitzt, wurde der Einfluss von DSCG (20, 40 mg/ml) auf eine 1%ige Zubereitung von HA in PBS (pH 6,0, $\mu = 0,201$) untersucht. Diese konzentrierte Lösung von HA zeigte ein schwach pseudoplastisches Fließverhalten, ohne nennenswerte Thixotropie und ohne Fließgrenze (Daten in Anhang 7.3 dargestellt). Das kann folgendermaßen erklärt werden: die linearen Molekülketten sind zu einem flexiblen Netzwerk verwickelt, das die Grundlage für die viskoelastischen Eigenschaften bildet [193]. Die rheologischen Eigenschaften von HA-Lösungen werden in erster Linie durch die Konfiguration des HA, in zweiter Linie durch seine stark milieuabhängige Konformation bestimmt [196]. Vor allem Art und Menge der Fremdelektrolytzusätze beeinflussen die stofflichen (Verschlaufungen, Verhakungen) und energetischen Interaktionen in der Polyelektrolytlösung [197].

Aus den Daten der Tabelle 31 lassen sich folgende Aussagen ableiten:

Fließverhalten (Fließkurve, $D = 10$ bis 100 1/s, auf und ab) (Graphen in 7.3 dargestellt, Fit nach Ostwald)

- Die Viskositäten $\eta_{D=1}$ nehmen in Abhängigkeit von der DSCG-Konzentration (0, 20, 40 mg/ml) zu. Dabei zeigt die Zubereitung aus HA und DSCG kaum thixotrope Eigenschaften (Hysteresisflächen < 2 Pa/s). Ein dreidimensionales Netzwerk durch zusätzliche sekundäre Bindungen scheint somit nicht zu entstehen.
- Die Belastungsabhängigkeit der Viskosität, wird kaum verändert ($p_{HA} \approx p_{HA/DSCG/20} \approx p_{HA/DSCG/40}$).

Oszillation (Frequenzsweep, $\omega = 0,1$ bis 10 Hz, $M = 0,8$ mNm) (Graphen in 7.3 dargestellt)

Die Anstiege m der Darstellung „ $\log G'$ gegen $\log \omega$ “ nehmen mit der DSCG-Konzentration zu (Tab. 31). Die HA-Moleküle liegen in einer weniger starren Konformation vor, werden beweglicher und können damit zwar stärker verschlaufen, aber unter Belastung auch schneller entschlaufen.

- Der $\tan \delta$ als Maß für das Verhältnis von viskosen zu elastischen Anteilen wird kleiner. Bei höheren Frequenzen dominiert für DSCG/40/HA das elastische Verhalten, die Elastizität der Mischung nimmt deutlich zu. Die weniger starre Konformation und die damit stärkere Verknäulung finden ihren Ausdruck in der stärkeren Frequenzabhängigkeit der Moduln (siehe zuvor). Da sich durch die veränderte Konformation auch gleichzeitig der Widerstand gegen das viskose Fließen erhöht (G'') (Ausrichtung in Fließrichtung durch Verknäulung behindert), steigt auch die Gesamtviskosität der natriumcromoglicathaltigen Systeme.

MC (0,68 %) in PBS zeigt generell das für Celluloseether typische pseudoplastische Fließverhalten. Bei hoher Konzentration (2,68 % (m/m)) tendiert das System zur Ausbildung einer Fließgrenze und zu thixotropem Fließen. Der DSCG-Zusatz verändert hier die rheologischen Eigenschaften kaum (Daten nicht dargestellt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden: der Natriumcromoglicatzusatz bewirkt eine Veränderung der Konformation der HA-Moleküle, die vermutlich durch den zusätzlichen Eintrag negativer Ladungen im Sinne einer weniger starken elektrischen Abschirmung der HA-Moleküle gegeneinander entsteht. Die Polymerketten werden besser hydratisiert; durch die stärkere Verschlaufung steigen Viskosität und Elastizität der Mischung.

DSCG bildet folglich mit HA in PBS ein System, das durch seine Kombination Mucinwechselwirkungen im Sinne einer zusätzlich gesteigerten Mukoadhäsivität, beruhend auf besserer Möglichkeit zur Interpenetration, zeigt. Die Interpenetrationsfähigkeit makromolekularer Stoffe liefert einen entscheidenden Beitrag bei der Entstehung mukoadhäsiver Wechselwirkungen [73], wobei die Flexibilität der Polymerketten entscheidend ist für ihre gegenseitige Interpenetration und Verschlaufung [83].

Tabelle 31: Rheologische Kenngrößen der Kombination HA/DSCG

	<i>Fließkurve</i>		<i>Frequenzsweep</i>	
	p	$\eta_{D=1}$ [Pas]	$\tan \delta$ [1]	m^1
HA	0,455	4,760	1,13	0,737
HA/DSCG/20	0,426	6,021	1,10	0,839
HA/DSCG/40	0,412	7,395	0,994	0,934

$$^1 m = \Delta \log G' [Pa] / \Delta \log \omega [s^{-1}]$$

4.3.3.5 *In-vitro-Liberation*

A *Einleitung*

Die mukoziliäre Clearance bedingt eine kurze Verweildauer auf der Nasenschleimhaut und wirkt damit der Permeation von Arzneistoffen prinzipiell entgegen. Darüber hinaus kann auch der Mukus selbst, ebenso wie das Epithel, eine Diffusionsbarriere darstellen [22, 75, 198]. Determinierend sind hierfür die physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffmoleküls (Molekülmasse, Ladung, Hydratationsradius, Fähigkeit zu Wasserstoffbrückenbindungen). Aber auch der Anteil von Glykoproteinen im nasalen Mukus, das Ausmaß der „Quervernetzungen“ der Mucinmoleküle und die Molekülmasse zwischen zwei Verbindungspunkten des Mucinnetzwerks nehmen Einfluss [71] (siehe Abb. 7). Bei Arzneistoffen, die in ausgeprägtem Maße mit den Glykoproteinen des nasalen Mukus wechselwirken, kann diese Interaktion unter Umständen sogar einen permeationsbegrenzenden Faktor darstellen und die systemische oder lokale Verfügbarkeit dadurch

verringert sein [199]. Insbesondere geladene Partikeln mit der Fähigkeit zu Wasserstoffbrückenbindungen und lipophile Partikeln sind davon betroffen [76, 198].

Die Diffusion gelöster, sphärischer Partikeln wird nach dem Gesetz von Stokes-Einstein auch durch die Viskosität beeinflusst (Gl. 12).

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

(Gl. 12)

D Diffusionskoeffizient

k_B Boltzmann-Konstante

η Viskosität

T Absolute Temperatur

r Hydrodynamischer Teilchenradius

Bei wässrigen Systemen mit makromolekularem Zusatz muss zwischen der Viskosität der Zubereitung und der des Diffusionsmediums unterschieden werden. Die „Makroviskosität“ der Zubereitung steigt durch die verschlungenen, hydratisierten Molekülketten an. Sie stellt eine Diffusionsbehinderung dar. Die Viskosität des Diffusionsmediums Wasser erfährt dabei keine Veränderung [192]. Daher ist nicht in jedem Fall mit einer Korrelation von Diffusionsquotient und Viskosität zu rechnen [89].

Liegt die Matrix durch Verknäulungen und ggf. zusätzliche sekundäre chemische Bindungen als ein dreidimensionales Netzwerk vor und sind die diffundierenden Wirkstoffpartikeln in die Matrix inkorporiert, so wird ihre Freisetzung aus dem Gerüst, als Voraussetzung zur Diffusion, zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Eine solche **matrixkontrollierte** Diffusion ist durch einen zunehmenden Diffusionsweg der Partikeln gekennzeichnet, d. h. die Diffusionsgeschwindigkeit der gelösten Partikeln ist zeitlich nicht mehr konstant, sondern nimmt mit der Zeit ab [192]. Dagegen bleibt die Diffusionsgeschwindigkeit in einem **diffusionskontrollierten** System nach Erreichen eines Steady-state-Zustandes konstant (Diffusionsgeschwindigkeit zur Grenzfläche ist gleich der Diffusionsgeschwindigkeit in der Grenzfläche).

Während das Permeationsmodell (↓ 3.3.2 und 4.2.2.2) den Durchtritt eines gelösten Stoffes durch eine Schicht (Membran) erfasst, dient das Liberationsmodell der Erfassung des Diffusionsverhaltens von gelösten Arzneistoffen aus einer praktisch unendlich dicken Schicht. Dementsprechend ist die Versuchsanordnung aus zwei Halbzellen so gestaltet, dass bei Einhaltung von Sink-Bedingungen im Freigabekompartiment (das Akzeptorvolumen wird im Kreislauf an der ruhenden Freigabeschicht vorbeibewegt) die Liberationsmembran (Nephrophan®) lediglich eine Trennfunktion für die Kompartimente erfüllt. Es gilt für die freigegebene Menge an gelöstem Arzneistoff:

$$Q = 2 \cdot A \cdot c_0 \sqrt{\frac{D_{app} \cdot t}{\pi}} \quad (Gl. 13)$$

$$D_{app} = \frac{(Q/\sqrt{t})^2 \cdot \pi}{4 \cdot c_0^2 \cdot A^2} \quad (Gl. 14)$$

Q Freigesetzte Arzneistoffmenge zur Zeit t [μg]

D_{app} Diffusionskoeffizient [cm^2/s]

c_0 Ausgangskonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]

A Diffusionsfläche [cm^2]

t Zeit [min]

Dieses entsprechend den Versuchsbedingungen aufgelöste Diffusionsgesetz, die **Higuchi-Gleichung**, beschreibt somit die matrixkontrollierte Diffusion. Charakteristisch für Daten solcher Freigabeuntersuchungen ist eine Wurzel/Zeit-Beziehung, die der Anfangskonzentration proportional ist [78].

Nach Gleichung 12 spielt auch der hydrodynamische Radius der gelösten diffundierenden Teilchen eine Rolle. Der Diffusionskoeffizient bei konstanter Viskosität ist dabei in guter Näherung der dritten Wurzel der Molekülmasse (MM) proportional [198]. Im Folgenden sind die anhand der gewonnenen Liberationsdaten berechneten Diffusionskoeffizienten der Arzneistoffe mit dieser präziseren Gleichung ermittelt worden ($\text{konstant } t = D_{app} \cdot MM^{1/3}$) [198].

B Untersuchungen

Es wurde das Liberationsverhalten von DSCG, OXY und FLU aus der Mucindispersion, ggf. nach Zusatz von HA, bestimmt (Probenansätze der rheologischen Untersuchungen (\downarrow 4.3.3.2 und \uparrow 5.2.5)). Die Untersuchung der Liberation von DSCG aus dem Gemisch mit Mucin sollte die direkte Wechselwirkung von DSCG mit den Mucinmolekülen bestätigen. Der Vergleich des Liberationsverhaltens von DSCG mit dem von OXY und FLU („Vergleichssubstanzen“), die nicht mit der Mucindispersion wechselwirken, diente dazu, den Einfluss der Wechselwirkung von DSCG mit Mucin auf dessen Freigabe und damit dessen nasale Verfügbarkeit zu ermitteln. Um den durch den DSCG-Zusatz zur Mucindispersion bedingten Viskositätsanstieg als Einflussparameter auf die Liberation (Gl. 12) der Vergleichssubstanzen zu eliminieren, wurde das Liberationsverhalten von OXY und FLU aus den natriumcromoglicathaltigen Mucinprobenansätzen erfasst. Die direkte Vergleichbarkeit der Liberationsdaten von DSCG mit denen von OXY und FLU war auf diese Weise gegeben.

Darüber hinaus wurde auch das Freigabeverhalten von DSCG aus dem HA-Gel bestimmt, um die Zubereitung in Hinblick auf eine für DSCG optimierte nasale Formulierung zu charakterisieren (\uparrow 4.3.4). Die Erfassung der Freigabe von DSCG aus dem isoviskosen Methylcellulosegel diente wiederum der Vergleichbarkeit (\downarrow 4.3.3.3).

Hypothesen:

- Liegt zwischen den Mucinmolekülen und DSCG eine direkte Wechselwirkung vor, sollte die Liberation von DSCG aus dem Gemisch mit Mucin über den makroviskositätsbedingten Rahmen hinaus behindert sein (Vergleich mit OXY und FLU). Eine verminderte Freigabe von DSCG aus Mucin, verglichen mit OXY und FLU, kann nur dann auftreten, wenn die Zunahme der Strukturviskosität der Mucindispersion durch DSCG-Zusatz nicht allein durch Veränderungen der Konformation der Mucinmoleküle bedingt ist (verstärkte inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen durch zusätzlichen Ladungseintrag infolge des DSCG-Zusatzes), sondern DSCG an den Mucinglykoproteinen „fixiert“ ist.
- Äußert sich die Wechselwirkung von DSCG mit den Mucinmolekülen in der Entstehung zusätzlicher dreidimensionaler Netzwerkkomponenten durch sekundäre Bindungen, sollte die Diffusion von OXY und FLU aus dem Gemisch Mucin/DSCG im Vergleich zum DSCG-freien Mucin zusätzlich behindert sein. Ursache für eine solche Verringerung wäre dabei der verkleinerte Abstand r zwischen den Ketten bzw. Kettenabschnitten (siehe Abb. 7) [83].
- Liegt darüber hinaus keine direkte Wechselwirkung zwischen HA und DSCG vor, sollte die Freisetzung von DSCG aus dem Gemisch mit Mucin im Vergleich mit OXY und FLU kaum zusätzlich beeinträchtigt werden. Das betrifft auch die Freisetzung aus dem mucinfreien System DSCG/HA.

Um eine negative Beeinflussung der rheologischen Parameter der Mucindispersion durch den Zusatz von OXY und FLU im Gemisch mit DSCG bzw. HA auszuschließen, wurden in Analogie zu 4.3.3.3 mit den Probenansätzen der Liberationsstudien Frequenzsweeps aufgenommen. Im Gegensatz zu OXY führte FLU in äquimolaren Konzentrationen zu DSCG zu einer deutlichen Abnahme von Viskosität und Elastizität des Mucin/DSCG-Gemisches. Daraus resultierend wurden die Liberationsstudien mit FLU lediglich mit einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. OXY wurde in DSCG äquimolarer Konzentration in den Liberationsstudien verwendet.

C Ergebnisse und Diskussion

Freigabeuntersuchungen aus den mucinhaltigen Probenansätzen

Tabelle 32 stellt die ermittelten Liberationsdaten zusammen. PBS wurde in jedem Fall verwendet.

Die Freigabe von OXY aus dem Gemisch mit Mucin ist, verglichen mit der Liberation von OXY aus dem mucinfreien PBS, signifikant (*t*-Test, siehe 7.7) um ca. 50 % reduziert. Bhat et al. [199] beschrieben für die Freigabe eines Arzneistoffes aus einer Mucindispersion, der mit den Glykoproteinen des Mucins keinerlei Wechselwirkungen eingeht, ebenfalls eine solche Verringerung in der freigegebenen Arzneistoffmenge. Die Verringerung der Freigabe von OXY aus der Mucindispersion liegt in der erhöhten „Makroviskosität“ der biopolymeren Zubereitung (verglichen mit Wasser) begründet. Die dreidimensionale Netzwerkstruktur der verschlungenen Mucinglykoproteine behindert die freie Diffusion von OXY ($D_{app\ OXY} > D_{app\ M/OXY}$ bei: $\eta_{D=1\ OXY}$ (1 mPas) $\ll \eta_{D=1\ M/OXY}$ (1,20 Pas)). Obwohl sich die „Makroviskosität“ der Mucindispersion durch den Zusatz des Polymeres HA deutlich erhöht (\downarrow 4.3.3.3, Tab. 28) ($\eta_{D=1\ M/OXY}$ (1,20 Pas) $< \eta_{D=1\ M/HA/OXY}$ (6,14 Pas)), erfährt der Diffusionskoeffizient von OXY keine signifikante Veränderung (*t*-Test, siehe 7.7) ($D_{app\ M/OXY} = D_{app\ M/HA/OXY}$). Es liegt durch den zusätzlichen Eintrag der HA-Molekülketten keine andere „Art“ der Diffusionsbehinderung für den Arzneistoff OXY vor.

Hingegen führt der Zusatz von DSCG zur Mucindispersion zu einer signifikanten (*t*-Test, siehe 7.7) Abnahme der freigegebenen Menge OXY, deren Ursache nicht allein die Zunahme der „Makroviskosität“ durch den DSCG-Zusatz sein kann ($D_{app\ M/OXY} = D_{app\ M/HA/OXY} < D_{app\ M/DSCG/OXY}$ bei: $\eta_{D=1\ M/OXY}$ (1,20 Pas) $< \eta_{D=1\ M/DSCG/10/OXY}$ (4,78 Pas) $< \eta_{D=1\ M/HA/OXY}$ (6,14 Pas)). Vielmehr scheinen die durch den DSCG-Zusatz entstehenden sekundären Bindungen in der dreidimensionalen Netzwerkstruktur des Mucins die Beweglichkeit des diffundierenden OXY nochmals deutlich einzuschränken. Dabei spielt wieder in Analogie zum HA-Zusatz zur Mucindispersion die „Art“ der Beweglichkeitseinschränkung infolge des DSCG-Zusatzes eine größere Rolle als ihre „Quantität“ ($D_{app\ M/DSCG/5/OXY} = D_{app\ M/DSCG/10/OXY}$ (nicht signifikant, (*t*-Test, siehe 7.7)) bei: $\eta_{D=1\ M/DSCG/5/OXY}$ (2,63 Pas) $< \eta_{D=1\ M/DSCG/10/OXY}$ (4,78 Pas)).

Tabelle 32: Liberation von DSCG und OXY aus verschiedenen Formulierungen mit Mucin¹

DSCG (5, 10 mg/g)				
	Q/\sqrt{t} [$\mu\text{g/s}^{1/2}$]	$D_{\text{app}} \times 10^{-5}$ [cm^2/s]	pD	Q_{60} [μg]
DSCG/5	30,41	5,743 \pm 0,015	4,241	1277,8 \pm 118,65
DSCG/10	58,03	5,230 \pm 0,008	4,281	2326,54 \pm 40,62
+ M + DSCG/5	6,45	0,239 \pm 0,001	5,622	246,90 \pm 10,63
+ DSCG/10	7,54	0,076 \pm 0,001	6,120	281,65 \pm 21,94
+ DSCG/5 + HA	5,97	0,205 \pm 0,0004	5,688	237,89 \pm 6,94
+ DSCG/10 + HA	6,97	0,066 \pm 0,006	6,184	293,97 \pm 50,27
OXY (2,9 mg/g)				
	Q/\sqrt{t} [$\mu\text{g/s}^{1/2}$]	$D_{\text{app}} \times 10^{-5}$ [cm^2/s]	pD	Q_{60} [μg]
OXY	23,91	8,838 \pm 0,028	4,054	1109,01 \pm 66,7
+ M	9,18	1,081 \pm 0,007	4,966	414,64 \pm 7,44
+ M + DSCG/5	6,32	0,618 \pm 0,055	5,209	295,14 \pm 22,92
+ DSCG/10	6,15	0,585 \pm 0,002	5,233	284,69 \pm 4,028
+ HA	8,77	1,189 \pm 0,002	4,925	381,61 \pm 5,98
+ DSCG/5 + HA	6,02	0,560 \pm 0,024	5,252	286,23 \pm 17,54
+ DSCG/10 + HA	5,71	0,504 \pm 0,004	5,298	269,52 \pm 21,83

¹ zum statistischen Vergleich der Liberationsdaten siehe 7.7 Q/\sqrt{t} Freigaberate, siehe Gl. 14pD negativ dekadischer Logarithmus des D_{app}

DSCG wird, verglichen mit OXY, aus der Mucindispersion signifikant (t -Test, siehe 7.7) schlechter freigesetzt ($D_{\text{app M/DSCG/5}} < D_{\text{app M/OXY}}$ bei gleicher $\eta_{\text{D=1}}$ (2,63)). Da die erhöhte „Makroviskosität“ des Mucin/DSCG-Gemisches keinen Einfluss auf die Freigabe von OXY nahm, muß die verringerte Freigabe von DSCG eine andere Ursache haben. Die Vermutung wird auch durch die Tatsache verstärkt, dass die Erhöhung der Konzentration des DSCG-Zusatzes nur auf die Freigabe von DSCG aus der Mucindispersion einen signifikanten (t -Test, siehe 7.7) Einfluss nimmt. Diese konzentrationsabhängige Verringerung in der freigegebenen Menge DSCG aus dem Gemisch mit Mucin schließt gleichzeitig den Unterschied in der Molekülmasse von DSCG und OXY als hauptsächlich Einfluss nehmenden Parameter aus. Letztlich scheint sich die Hypothese der rheologischen Untersuchungen, dass DSCG selbst an den zusätzlichen sekundären Bindungen zwischen oder innerhalb der Mucinmoleküle beteiligt ist, zu bestätigen. Das reduzierte Freigabeverhalten von DSCG aus Mucin spricht für eine „Fixierung“ der Substanz in der dreidimensionalen Gerüststruktur.

Diese reduzierte Freigabe von DSCG wird in Analogie zum Freigabeverhalten von OXY durch die Kombination von DSCG mit HA im Gemisch mit Mucin trotz deutlich erhöhter „Makroviskosität“ infolge des Polymerzusatzes nicht nennenswert weiter reduziert ($D_{\text{app M/DSCG/5}} = D_{\text{app M/DSCG/5/HA}}$ bzw. $D_{\text{app M/DSCG/5/OXY}} = D_{\text{app M/DSCG/5/HA/OXY}}$ (nicht signifikant, (*t*-Test, siehe 7.7) bei: $\eta_{D=1 \text{ M/DSCG/5}} (2,63 \text{ Pas}) < \eta_{D=1 \text{ M/DSCG/5/HA}} (7,83 \text{ Pas})$). Diese Tatsache spricht wiederum für eine direkte Fixierung des DSCG in der Netzwerkstruktur der Mucinglykoproteine. Gleichzeitig findet sich die Annahme der oszillationsrheologischen Untersuchungen bestätigt, dass die überadditive mukoadhäsive Komponente (↓ 4.3.3.3, Abb. 34) der Kombination HA/DSCG im Gemisch mit der Mucindispersion durch eine Verbesserung der Interpenetration der HA-Molekülketten in die Netzwerkstruktur des Mucins zustande kommt, da sich die Freigabe von DSCG aus dem Gemisch M/HA/DSCG nicht signifikant von der aus dem Gemisch M/DSCG unterscheidet. Eine Abnahme des DSCG-Effektes auf die Glykoproteinkomponenten des Mucins bei der Wechselwirkung beider Substanzen (mit der Mucindispersion) ist insofern ebenso auszuschließen. Die überadditive Komponente der rheologischen Synergismen (↓ 4.3.3.3, Abb. 34) scheint daher tatsächlich, wie die rheologischen Studien mit der mucinfreien Kombination DSCG/HA (↓ 4.3.3.4) vermuten lassen, durch die verbesserte Interpenetrationsfähigkeit der HA-Molekülketten in das Netzwerk der Mucinglykoproteine zu entstehen, die durch konformelle Änderungen des HA-Moleküls infolge des DSCG-Zusatzes bedingt ist.

Die dargestellten Ergebnisse der Liberationsversuche bestätigen die Behauptung, dass Freisetzungstudien aus dem Mucin/Arzneistoff-Gemisch zur Untersuchung von Mucin/Arzneistoff-Wechselwirkungen herangezogen werden können [198]. Wikman-Larhed et al. [198] geben an, dass dabei die Verwendung von ungereinigtem, lyophilisiertem Mucin, wie es in den vorliegenden Untersuchungen genutzt wurde, den In-vivo-Gegebenheiten näher kommt als der Einsatz reiner Glykoproteinkomponenten.

Die Ergebnisse der Liberationsstudie für FLU (Tab. 33) sind kritisch zu bewerten. Die vergleichsweise niedrigen D_{app} im Gegensatz zu OXY (Tab. 32) haben ihre Ursache in der geringen Ausgangskonzentration von FLU im Probenansatz. Die Auswertung der Daten mit der angewandten Gesetzmäßigkeit (Higuchi-Gleichung, Gl. 14) setzt praktisch konstante Ausgangskonzentrationen der freizugegebenen Substanz in der jeweiligen Matrix voraus. Die Konzentration von FLU im Gemisch mit Mucin über den Versuchszeitraum kann aufgrund der geringen Ausgangskonzentration nicht als konstant angenommen werden. Die Studien zeigen jedoch auch, dass die Ursache der Makroviskositätszunahme der Mucindispersion (zusätzliche sekundäre Bindungen im Mucinnetzwerk durch DSCG-Zusatz) einen größeren Einfluss hat als ihre Quantität (Anzahl zusätzlicher Bindungen durch DSCG in Abhängigkeit von dessen Konzentration).

Tabelle 33: Liberationsdaten FLU aus den mucinhaltigen Formulierungen

FLU (0,125 mg/g)				
	Q/\sqrt{t} [$\mu\text{g/s}^{1/2}$]	$D_{\text{app}} \times 10^{-5}$ [cm^2/s]	pD	Q_{60} [μg]
FLU	1,02	9,391 \pm 0,009	4,027	42,77 \pm 0,17
+ M	0,19	0,505 \pm 0,003	5,296	8,31 \pm 0,38
+ M + DSCG/5	0,17	0,372 \pm 0,011	5,429	7,22 \pm 0,30
+ DSCG/10	0,16	0,331 \pm 0,001	5,481	6,58 \pm 0,17
+ DSCG/5 + HA	0,16	0,360 \pm 0,001	5,443	6,78 \pm 0,51
+ DSCG/10 + HA	0,14	0,268 \pm 0,003	5,572	6,09 \pm 0,00

Q/\sqrt{t} Freigaberate, siehe Gl. 14

pD negativ dekadischer Logarithmus des D_{app}

Freigabeuntersuchungen von DSCG aus den polymerhaltigen Zubereitungen

In Analogie zu den oszillationsrheologischen Untersuchungen (\downarrow 4.3.3.3) und in Hinblick auf die beabsichtigte Verwendung der Kombination HA/DSCG in der In-vivo-Studie (\uparrow 4.3.4) wurde die Freigabe von DSCG aus der HA-Zubereitung bestimmt. Die Untersuchung der freigegebenen Menge DSCG aus einer isoviskosen (für $\eta_{D=10}$) MC-Zubereitung sollte den Vergleich der ermittelten Daten beider Freigabesysteme ermöglichen. Tabelle 34 stellt die gewonnenen Daten der Freisetzunguntersuchungen dar.

DSCG (20 mg/ml) wird aus den polymerhaltigen Zubereitungen (MC und HA) – trotz deren höherer „Makroviskosität“ ($\eta_{D=1}$) verglichen mit Mucin ($\eta_{D=1}$ HA/DSCG/20 (6,02 Pas) $>$ $\eta_{D=1}$ MC/DSCG/20 (3,87 Pas) $>$ $\eta_{D=1}$ M (1,20 Pas) – um ein Vielfaches signifikant (t -Test) besser freigesetzt als aus der Mucindispersion ($D_{\text{app HA/DSCG/20}} = D_{\text{app MC/DSCG/20}} > D_{\text{app M/DSCG/5}}$). Der Vergleich der Freigabe von DSCG (20 mg/ml) aus der MC-haltigen Zubereitung mit der aus dem HA-Gel zeigt ($D_{\text{app HA/DSCG/20}} = D_{\text{app MC/DSCG/20}}$, nicht signifikant (t -Test)), wie schon bei den rheologischen Untersuchungen (\downarrow 4.3.3.4), dass eine direkte Wechselwirkung zwischen DSCG und HA nicht vorliegen kann, zwischen DSCG und den Mucinglykoproteinen dagegen vorliegen muss.

Die signifikant (t -Test) verringerte Freigabe von DSCG (40 mg/ml) aus der Zubereitung HA/DSCG/40 könnte durch den bereits bei den Permeationsstudien festgestellten Effekt der Konzentration auf die thermodynamische Aktivität von DSCG und damit auf sein Diffusionsverhalten verursacht werden. Letztlich könnte aber auch die stärkere Entfaltung der makromolekularen Struktur des Natriumhyaluronats durch den DSCG-Zusatz (\downarrow 4.3.3.4) eine zusätzliche Diffusionsbehinderung für die Diffusion von DSCG darstellen.

Tabelle 34: Liberation von DSCG (20 bzw. 40 mg/ml) aus den polymerhaltigen Zubereitungen (HA (1 % (m/m)) und MC (1,34 % (m/m)) in PBS

	Q/\sqrt{t} [$\mu\text{g/s}^{1/2}$]	$D_{\text{app}} \times 10^{-5}$ [cm^2/s]	pD	Q_{60} [μg]
HA + DSCG/20	64,34	$1,68 \pm 0,003$	5,775	$2599,93 \pm 136,07$
+ DSCG/40	84,36	$0,77 \pm 0,006^*$	6,114	$3555,19 \pm 376,83$
MC + DSCG/20	64,11	$1,88 \pm 0,005$	5,726	$2514,34 \pm 206,92$
+ DSCG/40	105,39	$1,49 \pm 0,006^{**}$	5,827	$4177,24 \pm 239,10$

* signifikant verschieden vom Wert für DSCG/ 20 mg/ml (*t*-Test)

** signifikant verschieden vom Wert des anderen Polymers (*t*-Test)

Q/\sqrt{t} Freigaberate, siehe Gl. 14

pD negativ dekadischer Logarithmus des D_{app}

4.3.3.6 Resümee der rheologischen Untersuchungen und Mucinwechselwirkungsstudien

Eine Quantifizierung der Bindung von DSCG an Mucin mittels Gleichgewichtsdialyse durch einfache Nephrophan[®]-Membran war aufgrund der hohen osmotischen Aktivität der Mucindispersion nicht aussagefähig. Der niedrige Verteilungskoeffizient von DSCG ($\downarrow 4.2$) ließ andererseits eine Verwendung von Sandwichmembranen, wie z. B. nach Fedder [200], nicht zu. Als nachteilig erwiesen sich zudem die langen Versuchszeiten, die für den Konzentrationsausgleich zwischen den Kompartimenten bei der Dialyse benötigt wurden. Im Ergebnis durchgeführter Dialysen mit angeglichenen osmotischen Verhältnissen (NaCl-Zusatz) lagen im Gleichgewicht lediglich ca. 66,1 % der theoretischen Menge an DSCG, d. h. 33 % der absoluten Konzentration, im mucinfreien Kompartiment vor (Daten nicht dargestellt). Dieses Ergebnis ist jedoch kritisch zu betrachten, da sowohl der Einfluss der thermodynamischen Aktivität des Arzneistoffes als auch der des Donnaneeffekts [89] das Ergebnis verfälschen können.

In vivo ist die optimale Viskoelastizität der Mukusschicht ausschlaggebend für einen effektiven mukoziliären Transport. Die Viskosität ermöglicht die Übernahme der von den Zilien übertragenen Energie und die Elastizität die Rückkehr des Mukus zum ursprünglichen Zustand. Eine Überschreitung des Optimums dieser beiden Größen behindert gleichsam das Eindringen der Zilien in die Gelphase der Mukusschicht und durch die erhöhte Viskosität deren Fließen. Im In-vitro-Modell wurde bei einer Frequenz von 1 Hz bis hinauf oder hinab zu $G' = 10$ Pa (elastischer Modul) eine Verbesserung der Transportrate gefunden. Viskositäten mit 15 Pas werden als optimal betrachtet [68]. Bei allergischer Rhinitis ist häufig eine Abnahme von Viskosität und Elastizität zu beobachten [16, 68, 201], die zu einer

Abnahme der MCC führt, da die periziliäre Schicht durch verstärkte Sekretion zu voluminös wird [201]. Das Ausmaß der Verschlaufungen der Mucinmolekülketten reguliert die rheologischen Eigenschaften dabei mehr als das Ausmaß an Quervernetzungen [22], die im Falle von Wasserstoffbrückenbindungen lediglich der Stabilisierung der physikalischen Verwicklungen dienen. Dabei bestimmt die Hydratation der Glykoproteinketten des Mucins, die wiederum selbst von der makromolekularen Zusammensetzung und dem Ionengehalt abhängig ist, das Ausmaß der Verschlaufungen der makromolekularen Struktur des Biopolymers [68].

DSCG wechselwirkt mit der Mucin-Modelldispersion in ausgeprägtem Maße. Wie die Liberationsstudien bestätigt haben, ist dieser Arzneistoff selbst an den entstehenden dreidimensionalen Netzwerkkomponenten durch vorrangig sekundäre Bindungskräfte beteiligt. Letzteres führt zu einer ausgeprägten Zunahme der Elastizität und Viskosität von Mucin. Dieser Effekt zeigte sich bei dem gewählten Mischungsverhältnis von Mucin und Zubereitung bei Herstellung des Probenansatzes als weitgehend unabhängig von den Formulierungsparametern (↓ 4.2.2.2). Da jedoch die Ionenstärke der Modelldispersion relativ hoch ist – die 15%ige Modelldispersion besitzt eine Osmolalität von ca. 600 mOsmol/kg – kann eine Beeinflussung durch den Elektrolytgehalt nicht ausgeschlossen werden.

In Analogie zu den konzentrationsabhängigen physikalisch-chemischen Parametern von DSCG in PBS (↓ 4.3.1.1) ist ab 10 mg/ml, mit einsetzender Selbstassoziation des Arzneistoffes zu „kolloidalen“ Strukturen, keine weitere Zunahme des DSCG-Effektes auf die rheologischen Parameter der Mucinmodelldispersion zu beobachten. Die Wechselwirkung von DSCG mit den Mucinglykoproteinen liegt oberhalb der Grenzkonzentration (10 mg/ml), bei der die sprunghafte Bildung der „kolloidalen“ DSCG-Assoziate nachweisbar ist, unverändert vor. Dieses Verhalten erklärt sich durch die Tatsache, dass oberhalb der „CMC“ (Kritische Mizell- bzw. Assoziatbildungskonzentration) die Anzahl der DSCG-„Monomeren“ mit weiterer Konzentrationserhöhung konstant bleibt und mit den Bestandteilen des Mucins uneingeschränkt wechselwirken kann [159].

Die gefundene Veränderung der rheologischen Parameter von Mucin durch den DSCG-Zusatz könnte sich in vivo, in Hinblick auf die Veränderungen der nasalen Sekretion bei AR, positiv auf die Verweildauer der Substanz und auf die MCC auswirken. Gleichzeitig ist jedoch mit Einschränkung der Permeation von DSCG durch die Nasenschleimhaut infolge der Wechselwirkungen mit dem Mukus zu rechnen.

Eine Kombination der DSCG-Zubereitung mit HA könnte sich dabei als günstig erweisen, da bei überadditiver Zunahme mukoadhäsiver Effekte (↓ 4.3.3.3) die Freigabe von DSCG aus der Mucinschicht kaum verändert wird (↓ 4.3.3.5). Es könnte durch die Kombination von DSCG mit HA die Verweildauer von DSCG auf der Nasenschleimhaut weiter verlängert werden. Gleichzeitig wäre durch die Wechselwirkung von DSCG mit den Mucinglyko-

proteinen in Abhängigkeit von der DSCG-Konzentration nach Applikation auf der Nasenschleimhaut ein „matrixkontrolliertes“ Freigabesystem denkbar (↓ 4.3.3.5).

Ursache für die in den durchgeführten Untersuchungen festgestellte Wechselwirkung von DSCG mit der Mucindispersion, also ihre „Adhäsivität“, könnte wie bereits in 4.3.1.1 beschrieben, die Fähigkeit von DSCG sein, auf die Konformation von phosphorylierenden Enzymen Einfluss zu nehmen. Um an den Mastzellen zu wirken, muss DSCG zudem ein gewisses Adhäsionspotential besitzen, denn ein membranständiger Rezeptor konnte bisher nicht isoliert werden.

Die rheologischen Untersuchungen erfassen lediglich die Mukuskomponente der MCC. Eine Aussage zur Wirkung der Arznei- oder Hilfsstoffe auf die Zilientätigkeit kann aufgrund dieser Studien nicht getroffen werden. Batt et al. [46, 202] konnten zeigen, dass in vitro die Konservierungsmittel BAC und EDTA die Zilientätigkeit deutlich beeinträchtigen; in vivo wurde dagegen, zumindest nach einmaliger Applikation, keine Beeinträchtigung der MCC festgestellt. Die in diesem In-vitro-Modell zur Bestimmung der CBF fehlende Mukusschicht ist jedoch als Ursache für die Abweichung vom Ergebnis der In-vivo-Studie anzusehen. Der Mukus der nasalen Schleimhaut leistet also auch in Hinblick auf die Zilienverträglichkeit nasal applizierter Substanzen und Formulierungen einen Beitrag zur optimalen MCC [203].

Für DSCG war in vitro kein Einfluss auf die Zilienschlagfrequenz zu beobachten [203]. Die alpha-Sympathomimetika OXY und XYLO besitzen dagegen eine mit zunehmender Lipophilie steigende Zilientoxizität [204]; eine nervale Stimulation der Zilien ist ebenfalls beobachtet worden [21, 205]. HA zeigte nach Literaturbefunden in vitro keinen Einfluss auf die CBF [206]. Hypotonische Lösungen wiesen dagegen ziliostatische Effekte auf [207, 208]. Isotonischer Phosphatpuffer pH 6,0 beeinträchtigt die CBF nicht [209]. Untersuchungen zur CBF stellen lediglich ein Indiz für eine Toxizität dar, sind jedoch auf In-vivo-Verhältnisse nicht direkt übertragbar [209].

Die Widersprüchlichkeit hinsichtlich der zilientoxischen Wirkung einer Substanz in der Literatur [210] lässt zum einen den Nachteil der In-vitro-Anordnung zur Messung der Zilienschlagfrequenz (fehlende Mukusschicht) erkennen, zum anderen verdeutlicht sie den Einfluss von Formulierungsparametern hinsichtlich potentiell schädigender Substanzen [160]. So konnten Romeijn et al. [160] feststellen, dass das Isotonisierungsmittel Sorbitol die zilientoxische Wirkung von XYLO verstärkt. Eine verbesserte XYLO-Penetrationsfähigkeit, wie sie nach Sorbitol-Zugabe in der vorliegenden In-vitro-Permeationsstudie mit der Substanz (↓ 4.2.2.1) gefunden wurde, könnte in die gleiche Richtung weisen.

4.3.4 In-vivo-Studien am Kaninchen

4.3.4.1 Einleitung

Natriumcromoglicat wird nach peroraler Gabe lediglich zu 0,1 % resorbiert [103, 211]. Die Substanz wird nach der Resorption unverändert über Urin und Galle ausgeschieden. 90 % der absorbierten Menge haben den Organismus bereits nach 6 h wieder verlassen [103]. Aswania et al. [212] ermittelten nach peroraler Gabe einer Dosis von 20 mg DSCG am Menschen nach 24 h eine Gesamtmenge von 83 µg DSCG im Urin. Nach Inhalation der gleichen Dosis konnten hingegen 305,6 µg wiedergefunden werden, wobei der Arzneistoff rasch im Systemikum anflutete. Nach peroraler Gabe war jedoch eine deutliche Lag-time zu beobachten [212]. Am Auge werden aus wässriger Lösung 2 % DSCG resorbiert [213].

Angaben zur nasalen Verfügbarkeit von DSCG liegen lediglich am In-vivo-surgical-Modell der Ratte vor. Verglichen mit intravenöser Gabe wurden hier 60 % der applizierten Menge im Plasma gefunden [214], jedoch ist eine direkte Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse mit denen einer In-vivo-Studie nicht gegeben [39]. Als nachteilig am In-vivo-Rattenmodell erweist sich die kleine Nasenhöhle, die die Applikation von Nasensprays nicht zulässt [40]. Es ließen sich in der Literatur keine Angaben zur nasalen Absorption von Natriumcromoglicat am Kaninchen finden.

Die Übertragbarkeit von im Tierversuch gewonnenen pharmakokinetischen Daten auf den Menschen ist durch die stark differierenden physiologischen Gegebenheiten schwer möglich. Während beim erwachsenen Menschen das Verhältnis der Nasenhöhlenfläche [cm²] zur gesamten Körpermasse [kg] 2:1 beträgt, steht am Kaninchenmodell pro Kilogramm Körpergewicht 10mal soviel Resorptionsfläche zur Verfügung [38]. Zu bedenken ist ebenfalls, dass eine im Versuch durchgeführte Narkose nicht ohne Einfluss auf die Bioverfügbarkeit bleibt, da sie die mukoziliäre Clearance möglicherweise beeinflussen kann [16, 38, 215]. Dabei kann nicht nur die Art der Anästhesie [216], sondern auch das Anästhetikum selbst [217] Einfluss auf die MCC, den Atemstrom durch die Nase und den Blutstrom zur und weg von der Nasenschleimhaut nehmen [215]. Für das hier verwendete Anästhetikum Ketamin ist ein direkter Effekt auf die MCC auszuschließen, da es neurale Aktivitäten nicht beeinträchtigt [215].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von ausgewählten Formulierungsparametern auf die In-vivo-Verfügbarkeit von Natriumcromoglicat nach nasaler Applikation am anästhesierten Kaninchen (Ketamin/Xylazin) untersucht. Die DSCG-Formulierungen wurden jeweils vier bis sechs Kaninchen mittels eines Pumpdosiersprays (45 µl) appliziert. Die Blutentnahme aus der Ohrvene erfolgte zu sechs Entnahmezeiten über einen Zeitraum von 60 Minuten.

Kritisch zu den eigenen durchgeführten Untersuchungen (↑ 5.2.6) ist anzumerken, dass mittels Plasmawerten, die lediglich über einen Zeitraum von 60 Minuten gewonnen wurden, eine vollständige Erfassung der pharmakokinetischen Parameter einer Substanz nicht möglich ist. Ein längerer Blutentnahmezeitraum hätte jedoch wiederholtes Narkotisieren der Tiere erfordert, und die in der Folgezeit nur noch minimalen im Plasma vorhandenen DSCG-Mengen wären mit der zur Verfügung stehenden analytischen Methodik nicht detektierbar gewesen. Durch die geringe Anzahl der gewonnenen Plasmaeinzelergebnisse pro Tier war nur eine grobe Abschätzung der pharmakokinetischen Kenngrößen von DSCG nach nasaler Applikation an dem jeweiligen Tier möglich. Daher wurden bei der Auswertung der durchgeführten Studien die Einzelplasmawerte aller Tiere zu einer resultierenden Kurve vereinigt. Die Ergebnisse der In-vivo-Studie zur nasalen Verfügbarkeit von Natriumcromoglicat sind deshalb ohne Standardabweichungen angegeben; ein statistischer Vergleich war nicht möglich.

4.3.4.2 Einfluss der applizierten Konzentration von DSCG und von Natriumhyaluronat

Tabelle 35 stellt die Daten der pharmakokinetischen Analyse der Plasmawerte nach Applikation von DSCG verschiedener Konzentration in PBS dar. Auf diese Weise sollte die In-vivo-Relevanz der in vitro festgestellten „adhäsiven“ Eigenschaften und des konzentrationsabhängigen Permeationsverhaltens überprüft werden. Eine Kombination von 20 mg/ml DSCG und HA 1 % (m/V) in PBS, die in vitro potenzierte mukoadhäsive Fähigkeiten (↓ 4.3.3.3) aufwies, gelangte dabei ebenfalls zur Testung und Auswertung.

Als Kriterium für die mögliche Berechnung der AUC anhand von pharmakokinetischen Kennzahlen unter Annahme eines Einkompartimentmodells (↑ 5.2.6) galt die gute Anpassung der Plasmawerte ($R^2 > 0,9587$) an die Gerade der halblogarithmischen Darstellung bei der Ermittlung der Eliminationskonstante (Abb. 35) [218].

Kato et al. [219] konnten nach Inhalation von 20 oder 40 mg/ml DSCG keinen Unterschied in der absorbierten Menge finden. Auch am Auge unterschied sich die Bioverfügbarkeit von DSCG nach Applikation verschiedener Konzentrationen nicht [213]. Diese Befunde korrelieren mit den hier ermittelten Daten, die ebenfalls für eine Wirkstoffkonzentration von 10 bzw. 50 mg/ml DSCG keine unterschiedlichen AUC-Werte im Plasma erbrachten. Als Grund könnte dafür die gefundene Interaktion von DSCG mit den Mukuskomponenten angesehen werden. So wird nach einer Gabe von 50 mg/ml DSCG die Anflutung des Wirkstoffs gegenüber 10 mg/ml DSCG verlangsamt ($t_{\max 50} > t_{\max 10}$, $K_{in 50} < K_{in 10}$). Gleichzeitig verdeutlicht der Vergleich der pharmakokinetischen Daten nach Applikation einer Dosis von 50 mg/ml DSCG mit denen der 20 mg/ml-Dosis, dass die Wirkstofffreisetzung von DSCG aus dem Mukus durch die Wechselwirkung mit den Mucin-glykoproteinen behindert ist ($c_{\max 50}$, $AUC_{\infty 50}$, $t_{1/2 50} < c_{\max 20}$, $AUC_{\infty 20}$, $t_{1/2 20}$; $K_{el 50} > K_{el 20}$),

wie auch die Befunde der Libérationsstudien bestätigen (↓ 4.3.3.5). Nach Gabe einer Dosis von 50 mg/ml DSCG erfolgt die Freigabe des Arzneistoffes DSCG aus dem Mukus im Sinne eines „Depots“, wobei die Anflutung des Wirkstoffs im Systemikum durch die Mukus-interaktion, verglichen mit der Dosis von 10 mg/ml beeinträchtigt wird ($K_{in\ 50} < K_{in\ 10}$).

Tabelle 35: Pharmakokinetische Parameter¹ zur DSCG-Verfügbarkeit nach nasaler Applikation

Konzentration DSCG [mg/ml]	AUC_{∞} [$\mu\text{g min/ml}$]	t_{\max} [min]	c_{\max} [$\mu\text{g/ml}$]	K_{in} [1/min]	K_{el} [1/min]	$t_{1/2}$ [1/min]
10	126,03	6-10	0,37	27,66	0,23	176,17
20	160,94	6-10	0,67	25,14	0,22	187,55
50	124,37	14-22	0,55	13,17	0,51	81,51
20 + HA 1 %	288,69	6-10	0,24	27,36	0,05	910,89

¹ Zu den Größen AUC_{∞} , maximale Plasmakonzentration c_{\max} , Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration t_{\max} , Invasionskonstante K_{in} , Eliminationskonstante K_{el} , Halbwertszeit $t_{1/2}$ siehe 5.2.6 bzw. graphische Darstellung (Abb. 35)

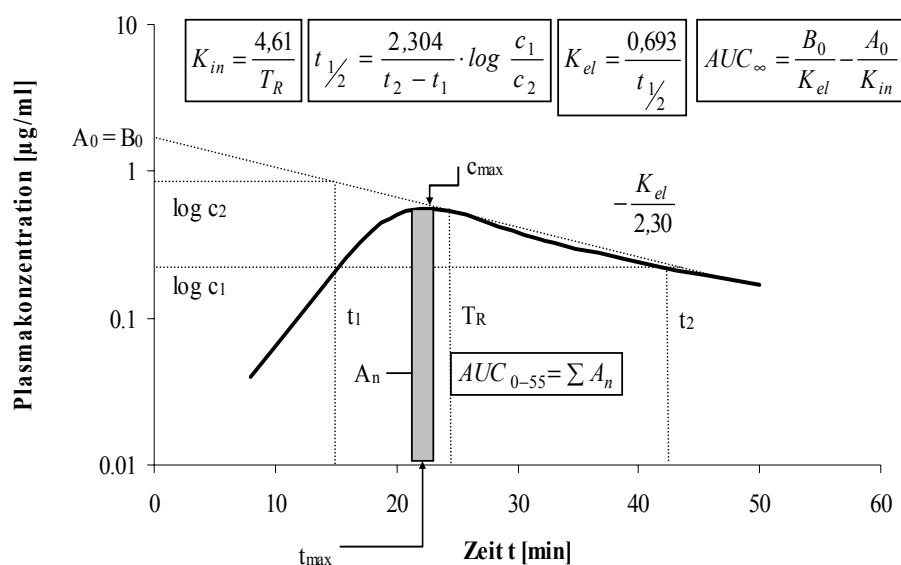


Abbildung 35: Plasmaspiegelkurve nach nasaler Gabe von DSCG (50 mg/ml) in PBS mit Darstellung der berechneten pharmakokinetischen Größen

Die pharmakokinetischen Daten von DSCG nach Applikation einer Dosis von 10 mg/ml unterscheiden sich von denen der Dosis mit einer Arzneistoffkonzentration von 20 mg/ml nur in der kleineren c_{\max} und der resultierenden AUC_{∞} , wofür die geringere Ausgangskonzentration als Ursache angesehen werden kann. Die AUC_{∞} der DSCG-Dosen 10 und 50 mg/ml unterscheiden sich nicht. Borchardt et al. [52] geben an, dass die Kombination aus

enhancer Wirkung – DSCG kann hier vergleichsweise als Enhancer betrachtet werden – und Mukoadhäsivität nur insofern günstig ist, wenn sie die Freisetzung von Enhancer und Arzneistoff aus dem Mukus nicht behindert. Es existiert ein optimaler Bereich hinsichtlich der Kombination beider Eigenschaften. Das bestätigen die Ergebnisse dieser Untersuchung und lassen die Applikation einer Dosis von 20 mg/ml als geeignete Wirkstoffkonzentration erscheinen.

Die letzte Aussage betrifft in gleicher Weise das Konzentrationsoptimum für viskositäts erhöhende, mukoadhäsive Zusätze [21] wie z. B. HA. Die Kombination mit dem Mukoadhäsivum verlängert die Verweildauer des Arzneistoffes in der durchgeführten Untersuchung auf der Nasenschleimhaut verglichen mit der Wirkstoffdosis von 20 mg/ml DSCG ($t_{1/2\ 20} < t_{1/2\ 20/HA}$). Durch das gute Freigabeverhalten des HA-Gels [220] und die nur unwesentlich schlechtere Freigabe von DSCG aus dem Gemisch mit dem Mukus (\downarrow 4.3.3.5) wird die Anflutung des Wirkstoffes DSCG im Systemikum nicht beeinträchtigt ($t_{\max\ HA/20} = t_{\max\ 20}$; $K_{in\ 20} = K_{in\ HA/20}$). Die AUC wird jedoch durch die stärkere Wechselwirkung der Kombination HA/DSCG mit dem Mukus trotz sinkender maximaler Plasmakonzentration vergrößert. Das gebildete „Depot“ erhöht dabei die Wirkungsdauer ($t_{1/2}$) durch die verlängerte Freigabe ($K_{el\ HA/20} \ll K_{el\ 20}$) sogar um das 5fache. Die in vitro festgestellte potenzierte Mukoadhäsivität (\downarrow 4.3.3.3) der Kombination HA/DSCG wirkt sich in einer verbesserten Verfügbarkeit in vivo aus.

Nasale In-situ-Verfügbarkeitsstudien (Ratte) eines Arzneistoffes in Kombination mit der als hervorragend mukoadhäsiv bekannten Polyacrylsäure [221] führten zu niedrigeren maximalen Plasmaspiegeln (c_{\max}) des Arzneistoffes, verglichen mit der polymerfreien Zubereitung [40]. Gleichzeitig war jedoch die systemische Verfügbarkeit des Arzneistoffes nach nasaler Applikation durch die verlängerte Verweildauer auf der Nasenschleimhaut über einen längeren Zeitraum gegeben. Dabei spielt die erhöhte Viskosität auf die Verweildauer der polymerhaltigen Zubereitung am Applikationsort eine nicht zu unterschätzende Rolle. Für ein HA-Gel wurde jedoch mittels Gammazintigraphie die okuläre Verweildauer um 50 % [222] gegenüber isoviskosen Lösungen anderer Polymere verlängert gefunden [223], was eindeutig für seine Mukoadhäsivität spricht. Für HA-Gele lassen sich somit, wie bereits erwähnt und durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt, sowohl in vitro als auch in vivo deutlich mukoadhäsive Fähigkeiten nachweisen [194, 224].

4.3.4.3 Einfluss der Formulierungsparameter (FAM)

Eine Berechnung der AUC anhand pharmakokinetischer Daten war bei den getesteten Fertigarzneimitteln nicht möglich, da die Kurvenanpassung der resultierenden Plasmaspiegelkurven bei log-linearer Regression rein zufällig war ($R^2 < 0,9587$, $p < 0,05$). Die Berechnung der AUC erfolgte über den Zeitraum von 0 bis 55 Minuten nach der Trapezregel [218]. Tabelle 36 gibt die Kenngrößen der Blutspiegelkurven wieder.

Tabelle 36: Einfluss der Formulierungsparameter auf die pharmakokinetischen Daten von DSCG (s. auch Abb. 35)

	$AUC_{0-55 \text{ min}}$ [$\mu\text{g min/ml}$]	t_{max} [min]	c_{max} [$\mu\text{g/ml}$]
PBS/10	82,46	6-10	0,37
PBS/20	100,61	6-10	0,67
PBS/50	82,25	14-22	0,55
PBS/20+ HA 1 %	83,81	6-10	0,24
Vividrin [®]	53,81	6-10	0,14
Cromo ratiopharm [®]	59,79	14-20	0,42
Cromo pur von ct [®]	77,02	6-10	0,44

Kano et al. [225] stellten fest, dass eine isotonische Lösung von DSCG eine größere asthmaprotektive Wirkung besaß als eine hypotonische. Su et al. [226] fanden heraus, dass hypotonische Lösungen die CBF stark reduzieren. Es ist daher anzunehmen, dass die deutlich verminderte Verfügbarkeit von DSCG nach Applikation der hypotonischen Zubereitung Cromo ratiopharm[®] gegenüber 20 mg/ml DSCG in PBS ihre Ursache in einer Reduzierung der mukoziliären Transportleistung durch die hypotonische Formulierung hat. Die nicht isotonisierte Zubereitung vermindert die Zilientätigkeit; die „adhäsive“ Wechselwirkung von DSCG mit dem nasalen Mukus wird durch die so fehlende „Scherung“ nicht beeinträchtigt. Die Freigabe des Arzneistoffes aus dem Mukus/DSCG-Gemisch ist stark verzögert (t_{max} 14-20 min); die Freigabecharakteristik ähnelt daher der 50 mg/ml-Dosis.

Auch die In-vivo-Verfügbarkeit ($AUC_{0-55 \text{ min}}$) des Arzneistoffes aus Vividrin[®] ist, verglichen mit der PBS-Lösung von 20 mg/ml DSCG, erniedrigt. Da der in vitro permeationsfördernde Effekt der Zubereitung für Rindernasenschleimhaut (\downarrow 4.3.1.1) in vivo nicht feststellbar ist und auch aus Cromo pur von ct[®] die Freigabe reduziert gegenüber 20 mg/ml DSCG ist, legt sich folgende Vermutung nahe: Die Formulierungsparameter der FAM beeinflussen mehr die Eigenschaften der Substanz selbst als dass sie einen direkten Effekt auf die Mukosa ausüben. Das isotone Phosphatpuffersystem der Referenzzubereitung (PBS/20) begünstigt dagegen,

wie bereits festgestellt (↓ 4.3.1.5), sowohl die Wechselwirkung der Substanz selbst mit der Membran, als auch mit den Mukuskomponenten.

Eine Korrelation zwischen In-vitro-Verfügbarkeit durch Rindernasenschleimhaut und In-vivo-Verfügbarkeit am Kaninchen ist anhand der in den durchgeführten Untersuchungen ermittelten Daten nicht möglich. Dazu ist die Anzahl der zum Einfluss der Formulierungsparameter auf die In-vivo-Verfügbarkeit von DSCG durchgeführten Versuche einerseits nicht ausreichend und andererseits erfasst der In-vitro-Permeationsversuch weniger die für die Bioverfügbarkeit von DSCG bedeutende Mucinwechselwirkung als vielmehr ihre Wechselwirkung mit der Membran. Die Permeation durch Nephrophan® erweist sich hingegen als nahezu störungsfreie Variante, um den Einfluss der Formulierungsparameter auf die Substanz DSCG zu erfassen. Erst die Kombination der In-vitro-Permeationsversuche mit DSCG an der biologischen und synthetischen Membran mit einer In-vivo-Studie, die statistische Aussagen zulässt, ist in der Lage die Vielzahl der DSCG-spezifischen Effekte (Membran-, Mukusinteraktionen, Formulierungseinfluss auf physikalisch-chemische Parameter) hinsichtlich ihrer In-vivo-Relevanz zu wichten.

4.3.4.4 Charakterisierung der Lösung aus Natriumhyaluronat und DSCG

Die In-vivo-Studien am Kaninchen haben die in vitro festgestellte Mukoadhäsivität (↓ 4.3.3.3) der Kombination aus DSCG/HA bestätigt (Tab. 35) und bewiesen, dass sie sich günstig auf die Verweildauer des Arzneistoffes auswirkt. Gleichzeitig ist, wie die Liberationsstudien bereits vermuten ließen (↓ 4.3.3.5), die Anflutung und Verfügbarkeit von DSCG (20 mg/ml) im Systemikum nach Applikation der mukoadhäsiven, viskositätserhöhten Zubereitung (HA 1 % in PBS) nicht beeinträchtigt. Die viskositätserhöhte Formulierung weist im Vergleich mit der Lösung von DSCG in PBS (20 mg/ml) eine deutlich erhöhte Bioverfügbarkeit auf, ohne dass dabei der Zeitpunkt des maximalen Plasmaspiegels verschoben wird.

DSCG wird aus einem 1%igen Natriumhyaluronatgel in PBS mit einer Freigaberate von $64,34 \mu\text{g/s}^{1/2}$ freigesetzt. Das entspricht einem Diffusionsquotienten D_{app} von $1,68 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ für DSCG (↓ 4.3.3.5). Die Viskosität $\eta = D_{100}$ der Formulierung liegt bei 419 mPas (Daten nicht dargestellt). Die durch den Phosphatpuffer isotonisierte Gelzubereitung besitzt einen pH-Wert von 6,0 und eine kaum erhöhte Dichte.

Die Dosierung aus dem Freigabesystem wurde gemäß der Prüfung auf Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis laut Ph. Eur. 2002 durchgeführt und mit $84,9 \pm 9,1 \%$ ermittelt. Die abgegebenen Dosen entsprachen der Prüfung, da keiner der ermittelten Einzelgehalte außerhalb der Grenzen von 75 bis 125 % lag (Daten nicht dargestellt).

Insbesondere die Sprühbarkeit der viskositätserhöhten Zubereitung erweist sich dabei als vorteilhaft. Die Verweildauer für Arzneistoffe in den nicht zilientragenden Regionen

(Vestibule) und den vorderen Nasenabschnitten wurde deutlich länger beschrieben [16, 17]. Da ein Nasenspray vorzugsweise auf diese vorderen Regionen trifft, z. B. im Vergleich mit Nasentropfen, werden per Spray applizierte Substanzen weniger schnell vom Absorptionsort entfernt [16, 227]. Zugleich wird die physiologische Schutzfunktion der MCC durch Applikation im vorderen Teil der Nase weniger stark beeinträchtigt [16].

Die sprühbare, gut verträgliche Zubereitung [206] mit ihren potenten mukoadhäsiven Eigenschaften stellt somit eine gute Möglichkeit dar, die Dosierungshäufigkeit zu reduzieren und damit die Compliance durch den Patienten zu erhöhen.

5 MATERIALIEN UND METHODEN

5.1 Materialien

5.1.1 Arzneistoffe

Natriumcromoglicat	ratiopharm GmbH, Ulm
Xylometazolinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Oxymetazolinchlorid	Merck Produkte GmbH, Darmstadt
Fluorescein-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

5.1.2 Fertigarzneimittel

Natriumcromoglicat

Cromo pur von ct [®]	ct-Arzneimittel, Berlin
Cromohexal [®]	Hexal AG, Holzkirchen
Cromohexal sanft [®]	Hexal AG, Holzkirchen
Cromo ratiopharm [®]	ratiopharm GmbH, Ulm
Vividrin [®]	Dr. Mann Pharma, Berlin

Xylometazolinhydrochlorid

Xylo von ct [®]	ct-Arzneimittel, Berlin
Nasan [®]	Hexal AG, Holzkirchen
Nasentropfen E ratiopharm [®]	ratiopharm GmbH, Ulm
Xylo comod [®]	Ursapharm, Saarbrücken

Oxymetazolinhydrochlorid

Nasivin [®]	Merck Produkte GmbH, Darmstadt
----------------------	--------------------------------

5.1.3 Hilfsstoffe

Tenside, Konservierungsmittel, Isotonisierungsmittel

Tween 80 [®] (Polysorbat, HLB-Wert 15)	E. Merck, Darmstadt
Benzalkoniumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Natrium-EDTA	Isocomerz, Herzberg
Phenylethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thiomersal	E. Merck, Darmstadt
Glukose	E. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Sorbitol	E. Merck, Darmstadt

Polymere

Hyaluronsäure, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methocel [®] (Methylcellulose, U.S.P. 4000 cP)	Fluka AG, Buchs, Schweiz

5.1.4 Pufferlösungen

Earles Balanced Salt Solution Modified (EBS pH 7.4)

Es wurde folgende Puffermischung verwendet:

- Calciumchlorid 0,265 g/l
- D-Glukose 1,0 g/l
- Kaliumchlorid 0,4 g/l
- Magnesiumsulfat 0,0977 g/l
- Natriumbicarbonat 2,2 g/l
- Natriummonohydrogenphosphat 0,122 g/l

Phosphatpuffer pH 5,5; 6,0 und 7,4

- Phosphatpuffersysteme List [131] pH 5,5; 6,0; 7,4 mit gleicher Molarität (LIST 5,5; 6,0; 7,4)
- Phosphatpuffersysteme Hager [228] pH 6,0 mit verschiedener Tonizität (PBS)

Natriumphosphatpuffer pH 3.0 (HPLC XYLO/OXY)

Natriumphosphatpuffer pH 5.2 (HPLC DSCG)

Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (Permeationsstudie)

Acetatpufferlösung pH 6,0 (Mucinwechselwirkungen)

Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 100 mM (Plasmaextraktion)

Erforderliche Elektrolyte	Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	E. Merck, Darmstadt
	D(+)-Glukose (wasserfrei)	E. Merck, Darmstadt
	Kaliumchlorid	Ferak Laborat, Berlin
	Magnesiumsulfat (wasserfrei)	E. Merck, Darmstadt
	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Ferak Laborat, Berlin
	Natriummonohydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Laborchemie, Apolda
	Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Laborchemie, Apolda
	Kaliumdihydrogenphosphat	Laborchemie, Apolda
	Natriumacetat ($\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Natriumhydroxid	Chemapol (Prag, CZ)
	Phosphorsäure 85 %	Laborchemie, Apolda
	Wasserfreie Essigsäure	E. Merck, Darmstadt

5.1.5 Chemikalien

HPLC

Acetonitril (analytical grade)	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Tetrabutylammoniumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Triethylamin	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Phosphorsäure 85 %	Laborchemie, Apolda
Pentansulfonsäure, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Rheologie

Mucin Type II: Crude	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
----------------------	--------------------------------------

Tierversuche

Ethylacetat	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Natrium-EDTA	Isocomerz, Herzberg
Salzsäure 36 %	E. Merck, Darmstadt
Isotonische Natriumchloridlösung	Delta Pharma, Pfullingen
Ursotamin [®]	Serum Werke, Bernburg
Rompun 2 % [®]	Bayer Vital GmbH, Leverkusen

Weitere Chemikalien

n-Oktanol (zur Analyse)	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Kaliumchlorid	Laborchemie, Apolda
Natriumcarbonat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$)	E. Merck, Darmstadt
L(+)-Weinsäure	E. Merck KgaA, Darmstadt
Folins-Ciocalteus Phenolreagenz	E. Merck, Darmstadt
Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Pyren	Riedel-de-Haen AG, Seelze
Precimat [®] (Gesamtproteinstandard)	Böhringer, Mannheim
LDH-Kit MPR 3 [®]	Böhringer, Mannheim
Sulfanilsäure	Serva, Feinchemika, Heidelberg
Amidoschwefelsäure	Ferak Laborat GmbH, Berlin
Natriumnitrit	Berlin-Chemie, Berlin

5.2 Methoden

5.2.1 Physikalisch-chemische Untersuchungen

5.2.1.1 *pH-Wert*

Der pH-Wert wurde mit einer Einstabmesskette Typ SE 101 (Knick, Elektronische Messgeräte GmbH & Co, Berlin) und einem Labor-pH-Meter 766 101 (Knick, Elektronische Messgeräte GmbH & Co, Berlin) bei RT bestimmt. Die automatische Kalibrierung des Messinstruments erfolgte bei Bedarf mit drei pH-Pufferlösungen (pH 2,00; 7,00; 9,00) (Mettler Toledo GmbH, Steinbach).

5.2.1.2 *Osmolalität*

Die Bestimmung der Osmolalität der verwendeten Puffer, Arzneistoff- und Hilfsstofflösungen erfolgte mittels eines Halbmikroosmometers (Knauer, Berlin). Zur Kalibrierung wurden bidestilliertes Wasser (0 mOsmol/kg) und eine Eichlösung (400 mOsmol/kg) (Knauer, Berlin) verwendet. Die angegebenen Tonizitäten sind die Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen bei RT.

5.2.1.3 *Oberflächenspannung*

Zur Erfassung der statischen Oberflächenspannung wurde das Tensiometer TE 1C (Lauda, Königshofen) nach Lecompte du Noüy verwendet. Als Messkörper diente ein Platin/Iridium-Ring. Die angegebenen Oberflächenspannungen [mN/m] sind die Mittelwerte aus der Anzahl Messwerte, die nötig waren, um eine Standardabweichung von 0,1 zu erreichen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

5.2.1.4

5.2.1.5 Dichte

Zur Ermittlung der Dichte wurde ein Density meter DMA 38 (Anton Paar KG, Graz, Österreich) verwendet. Die Kalibrierung des Messgerätes erfolgte bei der gewählten Messtemperatur (20 °C, 35 °C) unter Verwendung von bidestilliertem Wasser.

5.2.1.6 Dynamische Viskosität

Im Falle der Fertigarzneimittel wurde die kinematische Viskosität ν [m²/s] mittels eines Kapillarviskosimeters mit hängendem Kugelniveau nach Ubbelohde (Schott Geräte, Hofheim) bestimmt. Die Messtemperatur betrug 35 °C (Durchsichtthermostat CT 1450/2 und AVS 350, Schott, Hofheim). Die Umrechnung in die dynamische Viskosität η [Pas] erfolgte durch Multiplikation anhand der für die Messtemperatur bestimmten Dichte (↓ 5.2.1.4).

5.2.1.7 Leitfähigkeitsmessungen

Die Leitfähigkeiten wurden in den Side-Bi-SideTM-Diffusionszellen mittels einer Platinelektrode (eigene Konstruktion) in jedem Kompartiment oder mit der Leitfähigkeitsmesszelle (Forschungsinstitut Meinsberg) und der RLC-Universalmeßbrücke Typ E 313 (Meratronik, Polen) bestimmt. Die Platinierung der Elektroden erfolgte nach Schuppan [169]. Die Bestimmung der Zellkonstante erfolgte unter Verwendung einer 0,1 N Kaliumchloridlösung. Der Leitfähigkeitswert für diese Lösung bei der jeweiligen Messtemperatur wurde dem D'Ans Lax [229] entnommen. Anhand der bestimmten Zellkonstante erfolgte die Umrechnung der ermittelten Widerstände [Ω] in die jeweiligen Leitfähigkeiten [S/cm].

5.2.1.8 Verteilungskoeffizient

Der Verteilungskoeffizient als Maß für das Verteilungsverhalten eines Stoffes zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen wurde unter Verwendung von n-Oktanol als lipophiler Phase und Puffer bzw. Wasser als hydrophiler Phase bestimmt. Es wurden jeweils 5 x 10 ml arzneistoffhaltige Lösung und 1 x 10 ml arzneistofffreie Lösung (Blindwert) mit jeweils 10 ml des puffer- bzw. wassergesättigten n-Oktanols versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die abgetrennte, wässrige Phase wurde einer zusätzlichen Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge Z 230, Hermle AG, Gosheim) unterzogen. Die Arzneistoffgehalte in der wässrigen Phase nach dem Schütteln und die Ausgangsgehalte wurden mittels HPLC (XYLO, OXY) (↑ 5.2.2.3) bzw. photometrisch (DSCG) (↑ 5.2.2.5) bei einer Wellenlänge von 326 nm gegen einen Blindwert bestimmt.

Die angegebenen Verteilungskoeffizienten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$VK = \frac{V_W \cdot (c_W^0 - c_W^1)}{V_L \cdot c_W^1} \quad (\text{Gl. 15})$$

V_W Volumen der wässrigen Phase [ml]

V_L Volumen der lipophilen Phase [ml]

c_W^0 Ausgangskonzentration des Arzneistoffes in der wässrigen Phase [$\mu\text{g/ml}$]

c_W^1 Endkonzentration des Arzneistoffes in der wässrigen Phase [$\mu\text{g/ml}$]

5.2.1.9 Assoziatbildungen, Kritische Mizellbildungskonzentration

Tensiometrie

Zur Bestimmung der CMC der verwendeten Tenside wurde die unter 5.2.1.3 beschriebene Messanordnung verwendet. Mittels einer automatischen Bürette (665 Dosimat, Methrom, Herisau, Schweiz) wurde im logarithmischen Zugabemodus über einen Konzentrationsbereich von 5×10^{-5} bis $1,33 \times 10^{-1}$ g/l die Tensidstammlösung (0,2 g/l) in das vorgelegte Startvolumen von 40 ml Gereinigtem Wasser oder PBS titriert. Die dargestellten Werte sind Ergebnisse einer Dreifachbestimmung und wurden graphisch ausgewertet.

Fluorimetrie

Die fluorimetrische Bestimmung der CMC von PS und BAC erfolgte unter Verwendung einer methanolischen Pyrenstammlösung (10^{-7} M) [230]. Die Verdünnungen der Tensidlösungen in Gereinigtem Wasser oder PBS (ggf. mit DSCG-Zusatz) wurden nach Zusatz der Pyrenlösung zu 10,0 ml aufgefüllt und kräftig geschüttelt. Das Fluorimeter und die Geräteparameter zur Aufnahme der Exzitations- und Emissionsspektren sind unter 5.2.2.4 beschrieben. Die Exzitationsspektren wurden im Bereich von 300 bis 400 nm aufgenommen. Die dargestellten Werte entsprechen dem Verhältnis der Intensitäten bei einer Wellenlänge von 338 und 333 nm ($I_{338/333}$) und sind Ergebnisse einer Dreifachbestimmung. Analog zur Verschiebung des Intensitätsverhältnisses konnte eine bathochrome Verschiebung in den Emissionsspektren im Bereich von 450 bis 470 nm beobachtet werden. Die Auswertung erfolgte graphisch aus der halblogarithmischen Darstellung des Intensitätsverhältnisses bei der jeweiligen Konzentration.

UV/Vis- Spektroskopie

Der Nachweis der Assoziatbildung von DSCG erfolgte durch Aufnahme der Spektren der unverdünnten, entsprechend temperierten Lösungen (20 °C, 4 °C) im Bereich von 350 bis 450 nm mittels des UV/Vis-Scanning Spektralphotometers (Shimadzu Corporation, Japan) (↑ 5.2.2.5). Den Spektren wurde bei einer Wellenlänge von 395 nm die Absorption entnommen. Die dargestellten Werte sind Ergebnis einer Dreifachbestimmung. Die graphische Auswertung wurde anhand der halblogarithmischen Darstellung von Absorption gegen Konzentration vorgenommen.

Die Untersuchung auf mizellare Assoziationskolloide mit Eosin-Natrium erfolgte unter Verwendung einer 2×10^{-3} molaren wässrigen Stammlösung. 100,0 µl dieser Lösung wurden mit der entsprechenden Versuchslösung zu 20,0 ml verdünnt. Nach 24 h wurden die Absorptionsspektren von 500 bis 550 nm mittels des UV/Vis-Scanning Spektralphotometers (Shimadzu Corporation, Japan) (↑ 5.2.2.5) gegen das verwendete Medium aufgenommen. Die Höhe und die Lage des Absorptionsmaximums wurden bestimmt.

5.2.2 Gehaltsbestimmungen

5.2.2.1 Validierungsparameter

Die Validierung erfolgte anhand der in der analytischen Praxis üblichen Grundsätze [119, 120, 126]. Der Umfang der Validierung wurde dem beabsichtigten Zweck der Methode angepasst, so wurde z. B. in allen Fällen auf die Bestimmung der Nachweisgrenze verzichtet. Ebenso wurde nur die Wiederholpräzision (von Serie zu Serie und Tag zu Tag) überprüft, da stets derselbe Bearbeiter, im selbem Labor mit dem selbem Gerät die analytische Bestimmung durchführte (spektroskopische Verfahren DSCG, chromatographisches Verfahren XYLO und OXY).

Systemeignung (Optimierung chromatographischer Verfahren)

Die Optimierung der chromatographischen Verfahren erfolgte entsprechend gängiger Grundsätze [122, 126]. Die 95 % Konfidenzintervalle der Tailingfaktoren und Retentionszeiten wurden ermittelt.

Standards

Als Standards wurden zertifizierte Substanzen verwendet, deren Identität, Reinheit und Gehalt nachgewiesen wurden oder die Prüfung erfolgte gegebenenfalls (OXY, DSCG) entsprechend der Monographie einer aktuellen Pharmakopöe. Die Stabilität der Standardlösungen wurde bei Bedarf, d. h. soweit nicht anderweitig bestätigt (XYLO, OXY [231]), überprüft (DSCG, ↑ 5.2.10). Die Herstellung der Standardstammlösungen erfolgte durch Einwaage und Auffüllen auf das entsprechende Volumen mit Gereinigtem Wasser. Die Stammlösungen

wurden bei Bedarf entsprechend verdünnt. Für die Erstellung der Kalibriergeraden und die Erfassung von Präzision und Richtigkeit einer Methode kamen zur Herstellung der Standardlösungen jeweils andere Stammlösungen zum Einsatz.

Stabilität des Analyten

Die Stabilität des Analyten in der Matrix wurde bei Bedarf nach für die praktische Anwendung relevanten Lagerungsbedingungen (Kühlschrank) und ggf. nach einem Einfrier-, Auftauzyklus untersucht (Differenzentest).

Arbeitsbereich der Kalibrierfunktion

Die obere und untere Grenze des Konzentrationsbereiches der Kalibriergeraden richtete sich nach dem erwarteten Konzentrationsbereich des jeweiligen Analyten in den Proben. Auf Varianzhomogenität der oberen und unteren Konzentration sowie Linearität wurde geprüft. Die Kalibrierfunktion wurde durch Vermessen von sechs unabhängigen Einwaagen mit entsprechenden, äquidistanten Verdünnungen aufgenommen. Im Falle der Gehaltsbestimmung in einer Matrix wurde diese für die Herstellung der Kalibrierlösungen verwendet. Jede Lösung wurde dabei 6mal vermessen.

Präzision

Die Messpräzision wurde bereits mit der Ermittlung der Kalibrierfunktion durch das 6malige Vermessen der Standards erfasst.

Die Methodenpräzision wurde durch Vermessen (Doppelbestimmung) von sechs unabhängigen Lösungen (im unteren, mittleren und oberen Konzentrationsbereich der Kalibriergeraden) des jeweiligen Standards in der jeweiligen Matrix, die dem kompletten Analysenprozess unterworfen wurden, ermittelt. Die Vermessung erfolgte dreimal an einem Tag (intraday Präzision) und an drei aufeinander folgenden Tagen (interday Präzision). Die Präzision ist als Variationskoeffizient angegeben.

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde bei gegebener Linearität der Kalibrierfunktion, Spezifität und Wiederfindungsrate als gegeben betrachtet (spektroskopische Verfahren) oder erfolgte anhand der ermittelten Werte der Standardlösungen der Präzisionsbestimmung. Angegeben ist die prozentuale Abweichung vom richtigen Wert.

Im Falle von DSCG wurde die Richtigkeit der HPLC-Methode zusätzlich mittels eines Referenzverfahrens überprüft [119, 120]. Die Überprüfung erfolgte durch den Vergleich der Ergebnisse, die mittels HPLC ermittelt wurden, mit denen der Referenzmethode (USP XXIII, S. 430).

Die Wiederfindung wurde ggf. durch Aufstocken der betreffenden analytfreien Matrix mit der Kalibriersubstanz ermittelt. Sie ist angegeben als prozentuale Abweichung vom richtigen Wert und wurde ggf. bei der Ermittlung der Probenkonzentrationen berücksichtigt.

Spezifität

Bei den chromatographischen Verfahren wurde durch den Vergleich von Chromatogrammen und entsprechende Schnelltests auf Spezifität geprüft [119]. Bei den spektroskopischen Verfahren wurde gegen dokumentierte Spektren verglichen (DSCG: [95], OXY: [105], XYLO: [231]).

Robustheit (chromatographische Verfahren)

Die verwendeten chromatographischen Analysenmethoden wurden begrenzt auf Robustheit überprüft, da lediglich ein Bearbeiter und ein relevantes Gerät benutzt wurden. Die Verfahrensstabilität und dabei insbesondere zeitabhängige Komponenten und Lagerungsbedingungen (Kühlschrank, Raumtemperatur, Gefrierschrank) wurden mit der Präzisionsbestimmung erfasst.

Für die chromatographische Methode von DSCG wurde die Robustheit der Methode hinsichtlich des Wechsels von Labor und Gerät überprüft (Differenzentest).

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wurde anhand der Kalibrierfunktion nach dem Kalibrierverfahren ermittelt [119].

5.2.2.2 Qualitätssicherung während der Probenmessungen***Systemeignungstests (Chromatographische Verfahren)***

Die Systemeignung wurde mittels einer Lösung des jeweiligen Analyten überprüft. Regenerationsbedarf des Säulenmaterials deutete sich in allen Fällen in zunehmendem Tailing der Peaks bei kleiner werdenden Retentionszeiten an. Als Grenzen galten die 95 % Konfidenzintervalle der ermittelten Tailingfaktoren und Retentionszeiten (↑ 5.2.2.1).

Qualitätskontrollproben

Mit jeder Analysenserie wurden drei bis sechs Qualitätskontrollproben (QP) bekannter Konzentration analysiert (Doppelbestimmung von drei Konzentrationen), deren Konzentration sich aus dem Arbeitsbereich der Kalibriergeraden ergab. Die Kontrollgrenzen wurden aus der Methodenpräzision abgeleitet (wahrer Wert $\pm 2 \times$ Standardabweichung), da die in der Routineanwendung einer Methode analysierten Qualitätskontrollproben der Erkennung systematischer Fehler dienen. Zugleich dient die graphische Darstellung der Ergebnisse der Qualitätskontrollproben der Aufdeckung von Trends. Die Qualitätskontrollproben wurden bei einem Matrixeinfluss auf die quantitative Bestimmung unter Verwendung der jeweiligen Matrix hergestellt.

Kalibrierfunktion

Für jede Analysenserie wurde die charakteristische Kalibrierfunktion durch die Vermessung von Kalibrierproben ermittelt, die der Berechnung der unbekannten Konzentration der Proben sowie der der QP dienen. Die Bestimmung der Kalibrierfunktion erfolgte analog der Validierung und als Block vor der jeweiligen Analysenserie. In Fällen bei denen ein Matrixeinfluss auf die Kalibrierfunktion nicht vorlag, wurden wässrige Standards verwendet.

5.2.2.3 HPLC-Methoden

Die entwickelten HPLC-Methoden dienen der quantitativen Bestimmung von XYLO und OXY im Rahmen der Permeations- und Liberationsstudien. Die DSCG-Konzentrationen wurden im Rahmen der Liberations-, Penetrations- und In-vivo-Studien mittels HPLC erfasst.

Die Parameter der entwickelten Methoden sind unter 4.1 angeführt. Die allgemeinen chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 37 aufgelistet, die substanzspezifischen in Tabelle 38.

Tabelle 37: Allgemeine chromatographische Bedingungen

Gerät	L-6200 A Intelligent Pump, L-4500 Diode Array Detector oder L 4000 UV-Detektor, D-6000 Interface, AS-2000 A Autosampler (ggf.), Merck-Hitachi, Japan
Säule	LiCrospher® 100, RP-18 (5 µm), 125-4, Merck, Darmstadt
Vorsäule	LiCrospher® 100, RP-18 (5 µm), 4-4, Merck, Darmstadt
Injektionsvolumen	20 µl, Rheodyne, Cotati, California, USA

Tabelle 38: Spezielle chromatographische Bedingungen

	OXY	XYLO	DSCG	
			Gehaltsbestimmung	Plasmaanalytik
Mobile Phase	Acetonitril : Puffer ¹ (V/V)			
	45:55	70:30	75:25	80:20
Fließgeschwindigkeit	1,25 ml/min		1,0 ml/min	
Detektionswellenlänge	220 nm		240 nm	

¹ XYLO/OXY: 100 ml Reinstwasser werden mit 0,68 ml Phosphorsäure 85 % versetzt. Es wird mit Reinstwasser zu 800 ml aufgefüllt, der pH mit 0,1 N NaOH auf 3,0 eingestellt, Triethylamin zu 0,1 % (w/w) zugesetzt und der pH mit Phosphorsäure 10 % auf 2,6 eingestellt.

DSCG: 1,36 g KH₂PO₄ und 0,3224 g Tetrabutylammoniumbromid werden zu 1000,0 ml in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf 5,2 eingestellt.

5.2.2.4 Fluorimetrie

Die Fluorescein-Natrium Konzentrationen im Rahmen der Permeationsstudien und bei der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten wurden mit Hilfe des Spektrofluorometers RF 5001 PC (Shimadzu, Japan) nach entsprechender Verdünnung mit 0,01N NaOH bestimmt. Die Parameter der fluorimetrischen Bestimmung fasst Tabelle 39 zusammen.

Tabelle 39: Parameter der fluorimetrischen Fluorescein-Natrium-Bestimmung

Fluoreszenz-Bedingungen:	
Anregungswellenlänge	498 nm
Emissionswellenlänge	512 nm
Scangeschwindigkeit	High
Spaltbreite	3,0
Küvette	1ml Quarzküvette

5.2.2.5 UV/Vis-Spektroskopie

Die Durchführung der spektralphotometrischen Gehaltsbestimmungen erfolgte mittels UV/Vis-Scanning Spektralphotometer (Shimadzu Corporation, Japan). Die Bestimmung der Arzneistoffkonzentration erfolgte, ggf. nach entsprechender Verdünnung, in 1 cm Halbmikroquarzküvetten. Als Bezugsgrößen dienten Gereinigtes Wasser oder das beim Versuch eingesetzte Medium.

Die Absorption im Rahmen der Gehaltsbestimmung von Natriumcromoglicat wurde bei einer Wellenlänge von 326 nm ermittelt.

Für OXY und XYLO wurden die Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 220 nm bestimmt.

Im Rahmen von Vorversuchen zu den Permeationsstudien mit DSCG wurde überprüft, ob die verwendeten Hilfsstoffzusätze und/oder Puffersysteme einen Einfluss auf die spektralphotometrische Gehaltsbestimmung hatten. Es wurde die Wiederfindung von DSCG aus dem verwendeten Puffersystem, ggf. mit dem entsprechenden Hilfsstoffzusatz, bestimmt. Das Absorptionsmaximum und die Wellenlänge des Maximums wurden ermittelt.

5.2.3 In-vitro-Permeationen

Allgemeines

Die Permeationsstudien wurden in drei Side-Bi-SideTM-Diffusionszellen (Crown Glass Company, Sommerville, NJ, USA) (Abb. 5) durchgeführt. Diese bestehen aus zwei horizontalen Halbzellen mit einer Diffusionsfläche von 0,6362 cm², zwischen die die verwendete Membran eingespannt wird. Das Volumen je Halbzelle beträgt 3 ml. Über den thermostatisierbaren (Thermostat A 100, Lauda, Lauda-Königshofen) Wassermantel wurden die Zellen konstant auf 35 °C temperiert. Die Agitation der Medien in den Kompartimenten erfolgte durch Magnetrührer.

Zur Aufrechterhaltung der Vitalität der biologischen Membran wurden beide Kammern während des gesamten Versuches mit Carbogen[®] begast. Zudem wurde vor dem Permeationsversuch 30 min mit EBS vorinkubiert. Über die gesamte Versuchsdauer wurde über die Membran mittels Platinelektroden in jedem Kompartiment die Leitfähigkeit bestimmt (↓ 5.2.1.6).

Bei den Permeationsstudien wurde nach der Vorinkubation akzeptorseitig mit EBS, donatorseitig durch die Untersuchungslösung befüllt. Dabei waren beide Lösungen temperiert und begast.

Die Proben wurden im Abstand von 10 min über einen Zeitraum von 60 min aus dem Akzeptor entnommen und durch frisches Medium ergänzt. Die Bestimmung des Gehaltes erfolgte mittels HPLC (OXY, XYLO: ↓ 5.2.2.3)), fluorimetrisch (FLU: ↓ 5.2.2.4) oder spektralphotometrisch (DSCG: ↓ 5.2.2.5). Auf einen linearen Zusammenhang der permeierten Arzneistoffmenge pro Zeiteinheit wurde geprüft.

Bei Permeationsuntersuchungen (Vorinkubationsversuche) durch eine vorbehandelte Membran wurde anstelle von EBS donatorseitig mit der entsprechenden Hilfsstofflösung vorinkubiert. Vor dem eigentlichen Versuch erfolgte ein zweimaliges Spülen beider Kompartimente mit dem jeweiligen Puffersystem.

In den Donatoren und Akzeptoren wurden nach beendetem Versuch die Gesamtproteine bestimmt (↑ 5.2.7). Dargestellt sind die Werte von mindestens sechs Versuchen. Die Permeabilitätskoeffizienten sind mit ihrem Standardfehler (SEM), alle anderen Ergebnisse mit ihrer Standardabweichung (SD) angegeben.

Membranen

Zum Einsatz kam Rindernasenschleimhaut als biologische Membran und Nephrophan[®] als synthetische.

Die Rindernasenschleimhäute wurden von den Schlachthöfen Eberswalder Fleischwerke, Britz und Kasel-Golzig zur Verfügung gestellt. Die Entnahme des vorderen Teiles der Nasenmuschel erfolgte unmittelbar nach der Schlachtung der Tiere. Die entnommenen Stücke wurden in Carbogen[®]-begastem, eisgekühltem EBS ins Labor transportiert und unverzüglich verarbeitet. Aus den Nasenstücken wurden ca. 3-4 cm² große Schleimhautstücke durch vorsichtiges Abtrennen vom unterliegenden Bindegewebe präpariert.

Die synthetische Membran Nephrophan[®] (Filmfabrik, Wolfen) ist eine Dialysemembran aus regenerierter Cellulose mit einer Porengröße von ungefähr 2,4 nm und einer Dicke von 14 bis 15 µm [136]. Die Membran wurde vor dem Versuch in Gereinigtem Wasser gewässert, um die Imprägnierung mit Glycerol als Weichmacher zu entfernen.

5.2.4 In-vitro-Penetrationen

Die Penetrationsstudien mit Rindernasenschleimhaut wurden entweder in der unter 5.2.3 beschriebenen Art und Weise durchgeführt oder es wurde mit der Untersuchungslösung über den gleichen Zeitraum bei 35 °C und bei 100 U/min inkubiert (Schüttelinkubator 3032, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel). Während der Versuchsdauer von 1 h wurden keine Proben gezogen. Nach 60 min wurde die Mukosa entnommen und gespült. Die getrockneten Membranen wurden gewogen und nach Ultraschallaufschluss (Sonoplus HD 70 und UW 70, Bandelin electronic, Berlin) wie unter 5.2.6 aufgearbeitet und analysiert. In den Inkubationsflüssigkeiten, Spülflüssigkeiten und Donatoren/Akzeptoren wurden die DSCG und Proteingehalte nach 5.2.2.3, 5.2.6 und 5.2.7 bestimmt. Die dargestellten Werte sind Ergebnis einer Vierfachbestimmung.

5.2.5 Rheologische Untersuchungen

Die rheologischen Messungen erfolgten an der Universalmesseinrichtung UM Rheolab MC 100 (Physica, Stuttgart). Es kamen folgende Messsysteme (MS) zum Einsatz: MS-Z1 DIN und MS-KP 24 DIN. Die Temperierung erfolgte mittels des Kryostaten ecoline RE 104 (Lauda, Königshofen)

Als Modellschleim zur Erfassung der Mucinwechselwirkung diente eine Mucindispersion mit einer Konzentration von 20 % (m/m in PBS). Die Dispersion wurde hergestellt durch

12stündiges Quellen unter Rühren (Laborrührer IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.) bei Raumtemperatur.

5.2.5.1 Oszillationsrheologie

Mucinwechselwirkungen

Portionen der Mucindispersion (↓ 5.2.5) zu 3 g wurden eingefroren und bei Bedarf bei 4 °C aufgetaut. Nach Zusatz von 1 g Versuchslösung wurde unter Rühren 10 min homogenisiert und bei 4 °C equilibriert. Die Aufnahme der Sweeps erfolgte unter Verwendung des Messsystems MS-KP 24 DIN. Die Equilibrierung bei der jeweiligen Versuchstemperatur im Messsystem betrug 15 min.

Das Einfrieren der Proben hatte keinen Einfluss auf die bestimmten rheologischen Parameter und beobachteten Effekte (Differenzentest, $p < 0.005$).

Amplitudensweep

Vor jeder Messung erfolgte die Ermittlung des viskoelastischen Bereiches der Messsubstanz durch Aufnahme eines Amplitudensweeps bei 1 und 10 Hz mit Vorgabe eines Drehmomentes im Bereich von 0,5 bis 30 mN mit logarithmischer Steigerung.

Frequenzsweep

Die Aufnahme der Frequenzsweeps erfolgte bei dem im Amplitudensweep ermittelten, geeigneten Drehmoment über einen Frequenzbereich von 0,1 bis 10 Hz. Es wurden die rheologischen Parameter Verlustmodul G'' , Speichermodul G' und $\tan \delta$ mittels der Universalsoftware US 200 (Physica, Stuttgart) erfasst. Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgte mit MS-Excel®. Die dargestellten Werte sind Ergebnis einer Sechsfachbestimmung. Vergleichend ausgewertet wurden die oben erwähnten rheologischen Parameter, die den Frequenzsweeps bei einer mittleren Kreisfrequenz (16,9 1/s) entnommen wurden.

5.2.5.2 Rotationsrheologie

Dynamische Viskosität

Die Bestimmung der Viskositäten im Rahmen der Charakterisierung der DSCG-Lösungen erfolgte durch Schergeschwindigkeitsvorgabe in drei Stufen (250, 500, 750 1/s (KP 24) bzw. 500, 750, 1000 (Z 1 DIN)). Für jeden Einzelwert wurden pro Messreihe 50 Einzelwerte aufgenommen. Die angegebenen Werte sind Ergebnis einer Dreifachbestimmung.

Rheogramme

Proben der Mucindispersion (↓ 5.2.5.1) wurden nach Zusatz der Versuchslösung unter Rühren 10 min homogenisiert und bei 4 °C equilibriert. Die Aufnahme der Rheogramme erfolgte durch Vorgabe der Deformationsgeschwindigkeit im Bereich von 0 bis 10 1/s oder 10 bis 100

1/s bzw. umgekehrt. Für die Aufwärtskurve und Abwärtskurve wurden dabei 60 Einzelwerte aufgenommen. Die dargestellten Kurven sind Ergebnis einer Dreifachbestimmung.

Mukoadhäsionsindex

Der im Falle der Fertigarzneimittel bestimmte Mukoadhäsionsindex wurde nach dem modifizierten Verfahren [89] von Hassan und Gallo [88] durchgeführt. Die dabei bestimmten Viskositäten wurden durch Vorgabe von vier Schergeschwindigkeiten (25, 50, 75, 100 1/s) ermittelt. Für jede Viskosität wurden 15 Messwerte nach einer Vorscherung über 180 s aufgenommen. Die Messtemperatur betrug 35 °C. Die dargestellten Ergebnisse sind das Ergebnis einer Dreifachbestimmung.

Der Ansatz der Proben erfolgte nach 5.2.5.1. Das verwendete Messsystem war Z 1 DIN.

Die Auswertung erfolgte nach [89]. Dazu wurden die der Mukoadhäsion proportionalen Viskositätskomponenten η_b [Pa] aus den apparenten Viskositäten der Mucin/Proben-Gemische η_t und der 15%igen Mucindispersion η_m berechnet: $\eta_b = \eta_t - \eta_m$. Der Mukoadhäsionsindex $M-I_x$ [Pa] berechnet sich dann durch Multiplikation der Viskositätskomponente η_b [Pa] mit dem angelegten Schergefälle [1/s].

5.2.5.3 In-vitro-Liberationen

Die Liberationsstudien wurden in Freigabezellen nach Siebenbrodt [232] durchgeführt. Es wurde mit einem Akzeptorvolumen von 25 ml gearbeitet. Das Volumen der Donatorzelle betrug 1,5 ml. Das Freigabemedium in der Donatorzelle wurde nicht agitiert. Als Akzeptormedium wurde EBS verwendet und mittels einer Schlauchpumpe (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) im Kreislauf gepumpt. Die Versuche wurden bei 20 °C (Schüttelinkubator 3032, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) durchgeführt.

Der Ansatz der Proben erfolgte im Falle der mucinhaltigen Systeme nach 5.2.5.1. Nephrophan® wurde als Membran zur Trennung von Akzeptor- und Donatorkompartiment verwendet. Die Versuchsdauer betrug 60 min. Die Entnahme des Probenvolumens (1 ml) erfolgte alle 15 min. Das entnommene Volumen wurde durch EBS ergänzt. Nach entsprechender Verdünnung wurden die Gehalte von OXY und DSCG mittels HPLC (↓ 5.2.2.3) bestimmt. Im Falle von FLU kam zur Bestimmung der Gehalte die Fluorimetrie zum Einsatz (↓ 5.2.2.4). Es wurde jeweils eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Zur Bestimmung des Diffusionsquotienten wurde der Anstieg von „freigesetzter Arzneistoffmenge [µg/ml] gegen \sqrt{t} [min] „ermittelt. Die dargestellten Diffusionsquotienten sind mit ihren Standardfehlern (SEM) und die Q_{60} -Werte mit ihren Standardabweichungen (SD) angegeben.

5.2.6 In-vivo-Versuche

Die In-vivo-Versuche¹ wurden nach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes im Land Berlin beantragt und genehmigt. Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den Vorgaben des Tierschutzgesetzes: in Einzelkäfigen bei einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 12 h und freiem Zugang zu Wasser und Futter.

Die Versuche wurden an vier männlichen Albinokaninchen (New Zealand White, Charles River, Kißlegg, Deutschland) mit einem Gewicht von 3,0 bis 3,5 kg durchgeführt. Die Tiere erhielten während des Versuches eine Narkose (Ketamin 40 mg/kg, Xylazin 0,4 mg/ml, intramuskulär). Die nasalen Zubereitungen wurden mit Sprühsystemen der Firma Pfeiffer, Radolfzell mit drei Sprühstößen (à 45 µl) in ein Nasenloch appliziert. Die Entnahme des Blutes (Zusatz von 1 mg EDTA je ml Blut) erfolgte über einen Zeitraum von 60 min zu 6 sechs Zeiten aus der Ohrvene.

Das Blutplasma wurde durch Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge Z 230, Hermle AG, Gosheim) bei 4000 U/min über 15 min gewonnen.

Das gewonnene Plasma wurde wie folgt aufgearbeitet: Dem Plasma (0,2 ml) wurden definierte Volumina Ger. Wasser (0,5 ml), konzentrierte Salzsäure (0,18 ml) und Ethylacetat (1,5 ml) zugesetzt. Die Proben wurden 30 min geschüttelt und 15 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Eine definiertes Volumen Ethylacetat (1,2 ml) wurde abgenommen und mit 100 µl eines Kaliumphosphatpuffers pH 7,0 erneut 30 min geschüttelt. Nach der anschließenden Zentrifugation wurden die Reste des Ethylacetats abgedampft und die wässrigen Proben mittels HPLC (↓ 5.2.2.3) analysiert. Zusätzlich zu der Probenserie jedes Tieres wurden drei Qualitätskontrollproben (1, 2, 3 µg/ml) extrahiert.

Die Berechnung der AUC erfolgte entweder nach der Trapezregel [218] oder bei gegebener Anpassung der Werte an das Einkompartimentmodell anhand pharmakokinetischer Größen. Es wurden die Plasmaeinzelergebnisse aller Tiere zu einer resultierenden Plasmaspiegelkurve vereint (s. Abb. 35) [218].

Das dosierte Volumen eines Sprühstoßes des verwendeten Sprühsystems wurde durch Einsprühen einer DSCG-Lösung in einen Maßkolben mit anschließender photometrischer Bestimmung (↓ 5.2.2.5) aus den gemittelten Werten von 20 Sprühstößen ermittelt. Die Dosierungsgenauigkeit wurde entsprechend der Monographie Nasalia des Europäischen Arzneibuches geprüft.

Die Freisetzung von DSCG aus dem 1%igen Hyaluronat-Gel wurde nach 5.2.5.3 bestimmt.

¹ Herrn Prof. Borchert sei an dieser Stelle für die wertvolle Hilfe bei der Etablierung der Tierversuche herzlich gedankt.

Der Einfluss der Herkunft des verwendeten Plasmas (Schwein, Kaninchen) auf die Kalibriergerade wurde untersucht. Da sich die Achsenabschnitte und Steigungen der beiden Geraden nicht unterschieden (*t*-Test), wurde anstelle des Kaninchenplasmas Schweineplasma für die Kalibrierung verwendet.

5.2.7 Proteinbestimmungen

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Lowry [167]. Dabei wurden 0,4 ml der Prüflösung mit 2 ml einer frisch hergestellten Lösung von 0,01 % (m/m) Kupfer-II-sulfat und 0,016 % Weinsäure in 2%iger natronalkalischer (0,1 N) Natriumcarbonatlösung versetzt. Nach 10 min erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz. Die Extinktion bei 720 nm gegen einen Blindwert wurde frühestens nach 30 min und spätestens nach 60 min gemessen. Mit jeder Probe wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt.

Donatoren/Akzeptoren, Inkubations- und Spülflüssigkeiten

Die Kalibrierung erfolgte mit fünf geeigneten Konzentrationen eines Gesamtproteinstandards (60 mg/ml).

Die Prüflösungen und die Standardlösungen wurden vor der Bestimmung einer Ultrazentrifugation unterworfen. Es wurden Filtrationseinheiten (Nalgene® Mini Centrifuge Filter 4 kDa MMCO) der Firma Nalge Nunc International Corporation (Rochester, USA) mit einem Deadstop-Volumen von 10 µl verwendet. Die Zentrifugation bei 5000 U/min erfolgte mit der Eppendorfszentrifuge Z 230 (Hermle AG, Gosheim). Der Rückstand wurde zweimal mit Ger. Wasser durch Zentrifugation gewaschen. Nach der Zentrifugation wurden die Lösungen verdünnt und wie oben angegeben die Proteingehalte bestimmt. Für jedes System gelangten drei Donatoren und Akzeptoren zur Auswertung.

Membranen

Die Kalibrierung erfolgte mit fünf geeigneten Konzentrationen eines Gesamtproteinstandards (60 mg/ml). Die Standards wurden analog den Prüflösungen behandelt.

Die getrockneten Membranen (↓ 5.2.4) wurden durch den Zusatz von 1,25 N NaOH hydrolysiert. Nach der Filtration erfolgten eine Verdünnung mit Gereinigtem Wasser und die Bestimmung des Proteingehaltes nach oben beschriebener Verfahrensweise.

5.2.8 Gleichgewichtsdialysen

Die Gleichgewichtsdialysen erfolgten mit der Equilibrium Dialysis Apparatur (Dianorm, München) unter Verwendung von Teflon Dialysezellen Makro 1 (1,0 ml Arbeitsvolumen).

Zur Trennung der Kompartimente wurde gewässertes Nephrophan® (↓ 5.2.3) verwendet. Nach der Befüllung der Kompartimente wurde über 48 h bei Raumtemperatur dialysiert. Die

Arzneistoffgehalte in beiden Kompartimenten wurden nach entsprechender Verdünnung mittels HPLC (↓ 5.2.2.3) analysiert. Der osmotische Ausgleich im Falle der Liberation mit Mucin erfolgte durch Zusatz geeigneter Mengen Natriumchlorid.

5.2.9 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsuntersuchungen im Falle von DSCG wurden in den Pufferlösungen nach List (pH 5,4, 6 und 7) [131] und in Gereinigtem Wasser vorgenommen und wurden im Rahmen der Validierung der Analysenverfahren durchgeführt. Die Lösungen wurden über einen Zeitraum von drei Jahren bei 4 °C, Raumtemperatur und 40 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte durch Aufnahme der Spektren (↓ 5.2.2.5) nach Verdünnung und die Bestimmung der Lage und der Höhe des Absorptionsmaximums.

5.2.10 Statistik

Die Signifikanzprüfung erfolgte in allen Fällen auf einem Signifikanzniveau von 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit.

Normalverteilung

Die Prüfung auf Normalverteilung der Stichproben erfolgte mit dem Test nach **Kolmogoroff-Smirnoff** vor jeder statistischen Prüfung. Nur normalverteilte Stichproben gelangten zur Auswertung.

Mittelwertsvergleich zweier Stichproben (t-Test)

Auf Gleichheit der Varianzen wurde bei mittels **F-Test** geprüft. Bei gleicher Varianz erfolgte der Mittelwertsvergleich mittels **t-Test**, bei ungleicher Varianz mittels **Welch-Test**. Bei verbundenen Stichproben erfolgte die Signifikanzprüfung mittels **Differenzentest**.

Statistik der Geraden

Durch lineare Regression wurden die Achsenabschnitte und Steigungen der resultierenden Geraden ermittelt. Die Prüfung auf Linearität erfolgte durch eine **einfache Varianzanalyse**.

Mittelwertsvergleich mehrerer Stichproben (ANOVA)

Es wurde eine **einfache Varianzanalyse** mit anschließendem multiplen Vergleich der Mittelwerte nach **Tukey** durchgeführt. Die Prüfung auf Gleichheit der Varianzen erfolgte mit der Testmethode nach **Bartlett**.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die nasale Verfügbarkeit eines Arzneistoffes ist das Resultat eines komplexen Wechselspiels zwischen seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften, den vielfältigen Faktoren der applizierten Arzneiformulierung und den physiologischen Gegebenheiten. Verallgemeinerungen der Zusammenhänge sind schwierig und isolierte Effekte kaum zu erfassen. Abgesehen von den zahlreichen Einflussgrößen, muss jeder Arzneistoff separat betrachtet werden. Zielstellung der vorliegenden Arbeit waren vergleichende In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zur nasalen Verfügbarkeit von drei rhinologischen Wirkstoffen unter Einfluss wichtiger Formulierungsparameter.

Während im Resümee dieser Arbeit für die strukturanalogen Sympathomimetika Xylometazolinhydrochlorid (XYLO) und Oxymetazolinhydrochlorid (OXY) Zusammenhänge zwischen ihren physikochemischen Eigenschaften, ihrer In-vitro-Verfügbarkeit und den getesteten Formulierungsparametern aufgezeigt werden konnten, ist dies für das Antiallergikum Natriumcromoglicat (DSCG) nicht möglich und ein Querbezug nicht gegeben. DSCG weist eine ausgeprägte substanzspezifische Komponente auf, die sensibel auf eine Variation der Formulierungsparameter reagiert und in deren Abhängigkeit mit dem Absorptionsort Mukosa wechselwirkt.

Im Einzelnen führten die durchgeführten Untersuchungen zu folgenden Ergebnissen:

Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid

Die Untersuchungen mit den beiden Imidazolderivaten umfassten die physikalisch-chemische Charakterisierung von rezeptierten Arzneistofflösungen und einer Auswahl von Fertigarzneimitteln, In-vitro-Permeationsstudien an exzidiierter Rindernasenschleimhaut und an synthetischer Membran (Nephrophan[®] = regenerierte Cellulose) aus Rezepturen variierender Zusammensetzung und Handelspräparaten sowie deren rheologische Untersuchung im Hinblick auf Wechselwirkungen mit Mucin. Eine geeignete analytische Methode zur Quantifizierung der Arzneistoffe in einer komplexen Matrix wurde erstellt und validiert.

Die durchgeführten Permeationsstudien mit diesen beiden Wirkstoffen unterstreichen den Unterschied zwischen dem Einfluss der Komponenten der Arzneiform auf die Freigabe des Arzneistoffes einerseits und ihren direkten Einfluss auf die Integrität der biologischen Membran andererseits. Während an einer synthetischen Barriere (regenerierte Cellulose) weder für die beiden Arzneistoffe selbst noch für die getesteten Formulierungsparameter (Tonizität, Isotonisierungsmittel, Zusätze Benzalkoniumchlorid und EDTA) signifikante Unterschiede bzw. Einflussnahme festzustellen waren, unterschieden sich OXY und XYLO hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens an der Rindermukosa trotz nahezu identischer Molekülmasse deutlich. Ursache für die erhöhte Permeabilität der biologischen Membran für XYLO dürfte dessen größere Lipophilie sein. Die Verschiedenartigkeit der Einflussnahme der

Formulierungsparameter auf das mukosale Permeationsverhalten der beiden Testarzneistoffe legt nahe, dass für XYLO neben dem dominanten parazellulären der transzelluläre Transportprozess von Bedeutung ist. Der Zusatz des parazellulären Enhancers EDTA erhöhte z. B. die Permeabilität der Membran für das hydrophilere und damit vermutlich in erster Linie parazellulär permeierende OXY um ein Vielfaches mehr.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine erwünschte Isotonisierung nicht unkritisch erfolgen darf. So führte z. B. der isotonisierende Zusatz Sorbitol zu einer erhöhten Permeabilität der Mukosa für XYLO. Interessanterweise beschrieben Romeijn et al. [160] durch den Zusatz des Zuckeralkohols Sorbitol eine Verstärkung des toxischen Effektes dieses Sympathomimetikums auf die Zilien des nasalen Epithels.

Während der nachgewiesenen Potenzierung der zilientoxischen Eigenschaften von OXY bzw. XYLO in Kombination mit dem Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid in den im Handel befindlichen Präparaten durch konservierungsmittelfreie Applikationssysteme bereits Rechnung getragen wird, erfahren andere Formulierungsparameter bisher noch nicht genügend Beachtung. Das Substituieren eines wirkstoffgleichen Präparates durch eines mit veränderter Hilfsstoffzusammensetzung (Generikum) kann sowohl die Permeabilität der nasalen Mukosa verändern als auch die schädigende Wirkung der Substanzen auf die Zilien erhöhen.

XYLO und OXY zeigten keinen Effekt auf die rheologischen Parameter einer Mucinmodell-dispersion. Die beispielhaft überprüfte Freigabe von Oxymetazolinhydrochlorid aus dem Mukus wird nicht über den makroviskositätsbedingten Rahmen hinaus beeinträchtigt, d. h., es finden keine nachweisbaren Mucinwechselwirkungen statt.

Natriumcromoglicat

Die Untersuchungen mit Natriumcromoglicat schlossen wiederum die physikalisch-chemische Charakterisierung von Arzneistofflösungen und Fertigarzneimitteln, die In-vitro-Permeationsstudien an der biologischen und synthetischen Membran sowie darüber hinaus die Untersuchung des Penetrationsverhaltens von DSCG in Rindernasenschleimhaut ein. Der Einfluss verschiedener Formulierungsparameter wurde untersucht. Der Variation der Arzneistoffkonzentration kam dabei besondere Bedeutung zu. Rheologische Untersuchungen erfolgten sowohl zur Mucinwechselwirkung von DSCG als auch mit dem Polymer Natriumhyaluronat. In einer In-vivo-Studie an Kaninchen wurden verschiedene Rezepturen sowie Fertigarzneimittel überprüft. Eine geeignete analytische Methode zur Quantifizierung des Arzneistoffes in einer komplexen Matrix und im Rahmen der Plasmaanalytik wurde erstellt und validiert.

Die physikochemischen Eigenschaften (vor allem dynamische Viskosität, Osmolalität und spezifische Leitfähigkeit) von DSCG-Lösungen zeigten sich in differenzierter Weise von der Konzentration sowie der Art und Menge der zugesetzten Hilfsstoffe (insbesondere der

Elektrolyte) abhängig. Die Abweichung vom üblichen Verhalten eines starken Elektrolyten erklärt sich einerseits aus der auftretenden Assoziation einzelner Moleküle unterhalb von 10 mg/ml DSCG. Für DSCG-Lösungen oberhalb einer Konzentration von 10 mg/ml kann andererseits anhand des markanten Anstiegs der dynamischen Viskosität, der verlangsamten Diffusion und der auftretenden Opaleszenz die Bildung von Assoziaten im kolloidalen Größenbereich angenommen werden. Zusätze ionischer Verbindungen (Dinatriummonohydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid) können sowohl die intermolekularen Wechselwirkungen der assoziierten DSCG-Moleküle („Aussalzeffekte“) als auch ihre Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel Wasser (Hydrotropierung) verstärken.

Die Zusammensetzung der DSCG-Formulierung hinsichtlich Art und Menge der enthaltenen Hilfsstoffe sowie die Konzentration des Arzneistoffes selbst beeinflussten das Permeationsverhalten sowohl an der biologischen als auch an der synthetischen Membran beträchtlich. Während an der synthetischen Membran durch Konzentrationserhöhung von DSCG dessen thermodynamische Aktivität und damit die permeierte Menge pro Zeiteinheit gesenkt wird, liegt an der biologischen Membran ein abweichendes Verhalten vor. In Abhängigkeit von der Konzentration erhöhte DSCG (2 und 10 mg/ml) die parazelluläre Permeabilität der Rindernasenschleimhaut, vermutlich durch eine Wechselwirkung mit Bestandteilen des junctionalen Komplexes. Diese konzentrationsabhängigen, selbstenhancenden Fähigkeiten von DSCG ließen sich bei der Permeation des parazellulären Markers Fluorescein-Natrium durch eine mit 2 und 10 mg/ml DSCG vorinkubierte Rindermukosa eindeutig nachweisen. Aufgrund des bekannten pharmakologischen Wirkungsmechanismus von DSCG ist eine Wechselwirkung mit junctionalen Proteinen anzunehmen, die zu einer Erleichterung der parazellulären Transportmechanismen an der biologischen Membran führen kann. Gleichzeitig scheint aber eine mögliche Wechselwirkung von DSCG mit membranständigen Mukuskomponenten in einem bestimmten Konzentrationsbereich (4 bis 6 mg/ml) die permeierte Menge DSCG je Zeiteinheit zu senken, d. h. die selbstenhancenden Fähigkeiten konzentrationsabhängig einzuschränken. Wie jedoch die Ergebnisse der Penetrationsstudien zeigen konnten, determinieren offenbar die „adhäsiven“ Eigenschaften von DSCG, sodass die Gewebespiegel von DSCG (Ausgangskonzentration = 4 bis 6 mg/ml) steigen.

Nach nasaler Applikation eines Sprühstoßes mit einer Dosis von 20 mg/ml DSCG würde durch die physiologisch auftretende Verdünnung der applizierten Arzneistofflösung mit nasalem Sekret eine Konzentration von ca. 5 mg/ml DSCG resultieren. Die Ergebnisse der In-vitro-Permeations- und Penetrationsstudien lassen für DSCG dieser Konzentration (5 mg/ml) ein optimales Verhältnis aus Adhäsivität und Penetrationsfähigkeit vermuten, das geeignet scheint, die Gewebespiegel in der nasalen Schleimhaut zu erhöhen.

Bei der rheologischen Untersuchung mittels einer Mucinmodelldispersion konnten für DSCG mit einer Konzentration größer als 5 mg/ml „adhäsive“ Fähigkeiten bestätigt werden. Die

„Adhäsivität“ von DSCG äußert sich in einer deutlichen Zunahme von Elastizität und Viskosität der Mucinmodelldispersion, die durch eine Zunahme der intra- und/oder intermolekularen Wechselwirkungen der Mucinglykoproteine durch zusätzliche sekundäre Bindungskräfte bedingt ist. DSCG scheint an diesen Wechselwirkungen als „quervernetzendes“ Agens beteiligt zu sein, da die In-vitro-Liberation der Substanz aus dem Gemisch mit Mucin über den makroviskositätsbedingten Rahmen hinaus beeinträchtigt ist. Die „adhäsiven“ Fähigkeiten von DSCG nehmen mit steigender DSCG-Konzentration zu und erreichen bei 10 mg/ml DSCG einen maximalen Effekt, der sich durch weitere Konzentrationserhöhung nicht mehr steigern lässt.

Eine In-vitro-Mucinwechselwirkung von DSCG ist bisher noch nicht untersucht und in dieser Form beschrieben worden. Durch Kombination mit dem ebenfalls mukoadhäsiven Polymer Natriumhyaluronat (HA) lässt sich die „Adhäsivität“ überadditiv erhöhen. Erklärbar erscheint dieses Phänomen durch verbesserte Interpenetration von HA in das Mucinnetzwerk, bedingt durch von DSCG verursachte konformelle Veränderungen der HA-Polymerketten. DSCG begünstigt offenbar die Solvation der Polymerketten, d. h. deren intra- und/oder intermolekularen Wechselwirkungen.

Der durchgeführte In-vivo-Versuch bestätigte die Mukoadhäsivität der HA-haltigen DSCG-Zubereitung. Die Wirkungsdauer von DSCG wurde verlängert. Gleichzeitig resultierte durch die Fixierung von DSCG am nasalen Mukus im Sinne eines Depots eine kontrollierte Freigabe. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen an DSCG zeigten, dass die Substanz konzentrationsabhängig im Netzwerk des nasalen Mukus festgehalten wird. Wie auch die Liberationsversuche ergeben haben, existiert für die Verfügbarkeit ein Konzentrationsoptimum, da mit zunehmender Fixierung im Mucinnetzwerk bei steigender DSCG-Konzentration die Freigabe aus dem Mukusgemisch beeinträchtigt wird.

Die Formulierungsparameter nehmen ebenfalls auf die In-vivo-Verfügbarkeit von DSCG deutlich Einfluss, wie der Vergleich der pharmakokinetischen Daten nach Applikation von Fertigpräparaten mit denen einer Vergleichslösung gezeigt hat. Eine direkte Korrelation zwischen der In-vitro-Verfügbarkeit an Rindernasenschleimhaut und der Verfügbarkeit in vivo war jedoch für die untersuchten Fertigarzneimittel nicht zu konstatieren. Als ursächlich sind die im In-vitro-Modell fehlende bzw. nur abgeschwächt auftretende Mukuswechselwirkung und die geringe Anzahl der durchgeführten In-vivo-Versuche anzusehen. Daher scheinen die durchgeführten Nephrophan[®]-Permeationsversuche geeignet, den Einfluss der Formulierungsparameter auf die Substanz zu abstrahieren, wohingegen die In-vitro-Permeationsversuche an Rindermukosa die Wechselwirkungen der Substanz mit der Membran widerspiegeln. Jedoch erst der abschließende In-vivo-Versuch lässt eine Wichtung der Einzeleffekte hinsichtlich optimaler nasaler Verfügbarkeit von DSCG zu.

Für den Arzneistoff Natriumcromoglicat mit seinen besonderen physikalisch-chemischen Eigenschaften ergibt sich aus der Vielzahl der Einfluss nehmenden Parameter formulierungsseitig folgende Empfehlung: Einem isotonischen Phosphatpuffersystem ist der Vorzug zu geben, da auf diese Weise die Wechselwirkung der Substanz mit den Komponenten der nasalen Membran und des nasalen Mukus begünstigt wird und damit ein längeres Verweilen und ggf. eine kontrollierte Freigabe resultieren. Die Applikation einer Dosis von 20 mg/ml erwies sich dabei als günstig, da das „adhäsive“ Potential von DSCG durch Interaktion mit Membran und Mukus die Gewebespiegel im nasalen Gewebe erhöht und länger aufrecht erhält. Eine Kombination mit 1 % Natriumhyaluronat führte darüber hinaus zu einer vorteilhaft zusätzlich viskositätserhöhten, jedoch noch sprühfähigen und ausgeprägt mukoadhäsiven Zubereitung, die die Wirkungsdauer des Arzneistoffes deutlich verlängert und geeignet erscheint, die Dosierungshäufigkeit zu reduzieren. Auch eine bessere Akzeptanz der natriumhyaluronathaltigen Zubereitung durch den Patienten ist denkbar, die sich auf die Patient compliance bei der notwendigen prophylaktischen Applikation des Arzneistoffes positiv auswirken könnte. Weitere Untersuchungen, vor allem im klinischen Bereich, müssen die vorliegenden Befunde manifestieren.

7 ANHANG

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die Arzneistoffe zur Therapie der allergischen Rhinitis	6
Tabelle 2:	Validierungsparameter der entwickelten HPLC-Methoden für XYLO und OXY	27
Tabelle 3:	Validierungsparameter der entwickelten HPLC-Methoden für DSCG	29
Tabelle 4:	Wirkstoffparameter von DSCG, XYLO, OXY in PBS pH 6,0	30
Tabelle 5:	Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe in verschiedenen Puffern	30
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Fertigarzneimittel	31
Tabelle 7:	Physikalisch-chemische Parameter der Fertigarzneimittel	33
Tabelle 8:	Permeation der Arzneistoffe aus den Fertigarzneimitteln durch Rindernasenschleimhaut	36
Tabelle 9:	Permeation der Arzneistoffe aus den Fertigarzneimitteln durch Nephrophan®	37
Tabelle 10:	Permeation der Arzneistoffe und Fluorescein-Natrium ($c = 100 \mu\text{M}$) durch Rindernasenschleimhaut und Nephrophan®	41
Tabelle 11:	Einfluss von EDTA und BAC sowie deren Kombination auf die Permeation durch Rindernasenschleimhaut	45
Tabelle 12:	Einfluss der Tonizität auf die Permeation durch Rindernasenschleimhaut	47
Tabelle 13:	Einfluss des Isotonisierungsmittels auf die Permeation durch Rindernasenschleimhaut	49
Tabelle 14:	95 % Konfidenzintervalle der oszillationsrheologischen Größen des Mucins bzw. der Mucin/Arzneistoff-Mischungen	53
Tabelle 15:	Quellungsverhalten von Nephrophan® und Rindermukosa (Angabe in % (m/m) vom Trockengewicht)	59
Tabelle 16:	Einfluss der Konzentration von DSCG auf die Permeation durch Nephrophan®	64
Tabelle 17:	Permeation von DSCG in Abhängigkeit von der Konzentration durch Rindernasenschleimhaut	65
Tabelle 18:	Permeation von FLU ($100 \mu\text{M}$) aus EBS nach Vorinkubation der Mukosa mit DSCG (mg/ml)	68
Tabelle 19:	Oberflächenspannungen [mN/m] von PS 80 mit und ohne Zusatz von DSCG (mg/ml), VK von DSCG in Polysorbat 80-Lösungen verschiedener Konzentration	72
Tabelle 20:	Einfluss von Polysorbat 80 und EDTA auf die DSCG-Permeation durch Rindernasenschleimhaut	73
Tabelle 21:	Einfluss der Konservierungsmittel [% (m/V)] auf die DSCG-Permeation durch Rindernasenschleimhaut	75
Tabelle 22:	Einfluss der Ionenstärke μ des Puffers auf die dynamische Viskosität η [mPas] der entsprechenden DSCG-Lösung (20 mg/ml)	77
Tabelle 23:	Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem VK von DSCG (2 mg/ml) sowie der Art der enthaltenen Ionen	78
Tabelle 24:	Penetration von DSCG in Rindermukosa in Abhängigkeit vom Hilfsstoffzusatz	82
Tabelle 25:	Proteingehalte [mg] in den „Penetrationsflüssigkeiten“	83
Tabelle 26:	Penetration von DSCG in Rindernasenschleimhaut in Abhängigkeit von seiner Konzentration	83
Tabelle 27:	Proteingehalte [mg] in den „Penetrationsflüssigkeiten“ je mg Membran (Trockengewicht) in Abhängigkeit von der DSCG-Konzentration	84
Tabelle 28:	Rheologische Daten der Fließkurven aus Abb. 27	93
Tabelle 29:	Hysteresisflächen der Fließkurven aus Abb. 28	95
Tabelle 30:	Rheologische Kenngrößen der Frequenzsweeps (zur Statistik s. auch 7.6)	101
Tabelle 31:	Rheologische Kenngrößen der Kombination HA/DSCG	105
Tabelle 32:	Liberation von DSCG und OXY aus verschiedenen Formulierungen mit Mucin	110
Tabelle 33:	Liberationsdaten FLU aus den mucinhaltigen Formulierungen	112
Tabelle 34:	Liberation von DSCG (20 bzw. 40 mg/ml) aus den polymerhaltigen Zubereitungen (HA (1 % (m/m)) und MC (1,34 % (m/m)) in PBS	113
Tabelle 35:	Pharmakokinetische Parameter zur DSCG-Verfügbarkeit nach nasaler Applikation	118
Tabelle 36:	Einfluss der Formulierungsparameter auf die pharmakokinetischen Daten von DSCG (s. auch Abb. 35)	120
Tabelle 37:	Allgemeine chromatographische Bedingungen	131
Tabelle 38:	Spezielle chromatographische Bedingungen	131
Tabelle 39:	Parameter der fluorimetrischen Fluorescein-Natrium-Bestimmung	132

Tabelle 40:	Physikochemische Parameter der wässrigen DSCG-Lösungen (s. Abschnitt 4.2 und 4.3.1.1)	148
Tabelle 41:	Physikochemische Parameter der gepufferten (PBS) DSCG-Lösungen (s. Abschnitt 4.2 und 4.3.1.1)	148
Tabelle 42:	Physikochemische Parameter der verschieden gepufferten DSCG-Lösungen (s. Abschnitt 4.3.3.5)	148
Tabelle 43:	Physikalisch-chemische Parameter der wässrigen	148
Tabelle 44:	Permeationsdaten von DSCG, XYLO und OXY (0,0039 M) durch Nephrophan® unter dem Einfluss verschiedener Formulierungsparameter (siehe Abschnitt 4.2.2, Tab. 11 bis 13)	150
Tabelle 45:	Permeationsdaten von DSCG durch Nephrophan® unter dem Einfluss verschiedener Formulierungsparameter	151
Tabelle 46:	Statistische Vergleiche der Mucinwechselwirkungen: Vergleich von G' (siehe Tab. 30, Abschnitt 4.3.3.3)	153
Tabelle 47:	Statistische Vergleiche der Mucinwechselwirkungen: Vergleich von m (siehe Tab. 30, Abschnitt 4.3.3.3)	153
Tabelle 48:	Statistischer Vergleich (t-Test) der Liberationsdaten von DSCG gegen DSCG (siehe Tab. 32 Abschnitt 4.3.3.5)	154
Tabelle 49:	Statistischer Vergleich (t-Test) der Liberationsdaten von OXY gegen DSCG (siehe Tab. 32 Abschnitt 4.3.3.5)	154
Tabelle 50:	Statistischer Vergleich (t-Test) der Liberationsdaten von OXY gegen OXY (siehe Tab. 32 Abschnitt 4.3.3.5)	154

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Lateraler Schnitt durch die menschliche Nasenhöhle; nach [14]	4
Abbildung 2:	Einfluss nehmende Parameter auf die nasale Verfügbarkeit eines Arzneistoffes aus der Arzneiform „Nasentropfen“; erstellt nach [5, 21, 36, 37]	9
Abbildung 3:	Mikroskopischer Schnitt durch das humane Respirationsepithel; nach [15]	11
Abbildung 4:	Transportmechanismen durch die nasale Mukosa; modifiziert nach [50] ZO = Zonula occludens (siehe Text)	11
Abbildung 5:	Side-Bi-Side TM -Apparatur; nach [66]	13
Abbildung 6:	Zilientätigkeit und Mukusschicht; modifiziert nach [22]	14
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Struktur der Mukusglykoproteine; modifiziert nach [71]	15
Abbildung 8:	Natriumcromoglicat	18
Abbildung 9:	Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid	20
Abbildung 10:	Benzalkoniumchlorid	21
Abbildung 11:	Natriumedetat	22
Abbildung 12:	Disaccharidbaustein des Natriumhyaluronat	23
Abbildung 13:	Chromatogramme von OXY und XYLO	27
Abbildung 14:	Chromatogramme DSCG: Plasmaanalytik und Routineanalytik	29
Abbildung 15:	Mukoadhäsionsindizes der FAM ($\omega = 16,9$ 1/s)	39
Abbildung 16:	Permeation der Arzneistoffe (0,0039 M) durch Rindernasenschleimhaut	42
Abbildung 17:	Veränderung der Leitfähigkeit über die Versuchsdauer mit Nephrophan [®] (----) oder Rindernasenschleimhaut (—) als Membran	58
Abbildung 18:	Dynamische Viskosität [mPas] von DSCG steigender Konzentration in PBS	61
Abbildung 19:	Photometrische Bestimmung der „CMC“ von DSCG	63
Abbildung 20:	Einfluss der Konzentration auf die Permeation von DSCG durch Rindermukosa	65
Abbildung 21:	Einfluss der Vorinkubation mit DSCG (PBS) auf die Permeation von FLU	70
Abbildung 22:	Fluorimetrische CMC-Bestimmung von Polysorbat 80	72
Abbildung 23:	Fluorimetrische CMC-Bestimmung von BAC	75
Abbildung 24:	Einfluss verschiedener Konservierungsmittel auf die Permeation von DSCG durch Rindermukosa	76
Abbildung 25:	Kartenblattmodell; modifiziert nach [187]	86
Abbildung 26:	Schematische Darstellung der Größen im Oszillationsversuch; modifiziert nach [191]	89
Abbildung 27:	Fließkurven von Mucin mit Zusatz von DSCG (5, 10 mg/g) und/oder HA im Bereich von D = 10 bis 100 [1/s]	93
Abbildung 28:	Fließkurven von Mucin mit Zusatz von DSCG (5, 10 mg/g) und /oder HA im Bereich von D = 0 bis 10 [1/s]	94
Abbildung 29:	Frequenzsweep von Mucin	96
Abbildung 30:	Frequenzsweeps von Mucin mit DSCG unterschiedlicher Konzentration (5, 10 mg/g)	98
Abbildung 31:	Frequenzsweeps von Mucin unter Zugabe der Polymere HA (links) und MC (rechts)	99
Abbildung 32:	Frequenzsweeps von Mucin unter Zugabe von MC und DSCG (5 mg/g)	99
Abbildung 33:	Frequenzsweeps von Mucin unter Zugabe von HA/DSCG/5 (links) und HA/DSCG/10 (rechts)	100
Abbildung 34:	Rheologische Synergismen $\Delta G'$ [Pa]	102
Abbildung 35:	Plasmaspiegelkurve nach nasaler Gabe von DSCG (50 mg/ml) in PBS	118
Abbildung 36:	Fließkurve DSCG (50 mg/ml) in PBS, D = 10-100 1/s (siehe auch Abschnitt 4.3.1.1)	149
Abbildung 37:	Fließkurven HA 1% (m/m) in PBS mit und ohne Zusatz von DSCG (20, 40 mg/ml), D = 10-100 1/s (siehe Abschnitt 4.3.3.4)	149
Abbildung 38:	Frequenzsweep HA 1% (m/m) in PBS mit und ohne Zusatz von DSCG (20, 40 mg/ml)(siehe Abschnitt 4.3.3.4)	149
Abbildung 39:	Tensiometrische CMC-Bestimmung von BAC und PS 80	152
Abbildung 40:	Fluorimetrische CMC-Bestimmung von BAC und PS 80: Einfluss von DSCG (0,0025 %)	153

7.3 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Arzneistofflösungen

Tabelle 40: Physikochemische Parameter der wässrigen DSCG-Lösungen (s. Abschnitt 4.2 und 4.3.1.1)

Konz. [mg/ml]	pH	Osmolalität [mOsmol/kg]	DV [mPas]		OFS [mN/m]	Dichte [g/cm ³]	LF x 10 ⁻² [S/m]	
			4 °C	20°C			4 °C	20°C
2	6,19	10	1,60	1,037	72,22	0,998	0,084	0,081
6	6,33	24	1,48	1,008	72,00	1,011	0,12	0,16
10	6,66	44	1,53	1,107	71,80	1,002	0,17	0,28
15	6,19	53	1,51	1,090	68,06	1,004	0,25	0,44
20	6,32	63	1,82	1,102	71,38	1,007	0,32	0,60
40	6,41	68	3,63	1,147	71,95	1,016	0,52	1,16

Tabelle 41: Physikochemische Parameter der gepufferten (PBS) DSCG-Lösungen (s. Abschnitt 4.2 und 4.3.1.1)

Konz. [mg/ml]	Osmolalität [mOsmol/kg]	DV [mPas]		OFS [mN/m]	Dichte [g/cm ³]	LF x 10 ⁻² [S/m]	
		4 °C	20°C			4 °C	20°C
2	270	1,75	1,012	72,02	1,012	0,95	0,78
4	271	1,51	1,000	71,97	1,013	0,99	0,80
6	275	1,81	1,076	71,78	1,014	1,02	0,81
8	270	1,99	1,161	71,68	1,014	1,04	0,83
10	275	5,75	1,114	71,10	1,015	1,08	0,83
20	285	19,45	1,126	72,23	1,018	1,09	0,88
30	296	52,04	1,284	72,26	1,028	1,09	0,91
40	306	70,35	3,560	66,01	1,031	1,11	0,94
50	316	108,85	9,710	72,25	1,013	1,15	0,98

Tabelle 42: Physikochemische Parameter der verschieden gepufferten DSCG-Lösungen (s. Abschnitt 4.3.3.5)

	280	PBS (mOsmol/kg)				isoton		
		350	170	70 ohne		+ Sorbitol	+ Glukose	+ NaCl
PBS								
LF x 10 ⁻² [S/m]	0,756	1,364	0,906	0,291	0,233	0,247	1,483	
Osmolalität [mOsmol/kg]	270	352	167	66	285	283	285	
PBS mit Zusatz von DSCG (2 mg/ml)								
LF x 10 ⁻² [S/m]	0,756	1,334	0,951	0,340	0,265	0,279	1,465	
Osmolalität [mOsmol/kg]	270	354	176	75	289	292	291	
PBS mit Zusatz von DSCG (20 mg/ml)								
LF x 10 ⁻² [S/m]	0,878	1,567	1,115	0,781	0,539	0,546	1,665	
Osmolalität [mOsmol/kg]	285	371	291	107	325	323	306	

Tabelle 43: Physikalisch-chemische Parameter der wässrigen Lösungen von OXY und XYLO (s. Abschnitt 4.2)

	pH	Osmolalität [mOsmol/kg]	DV [mPas]	OFS [mN/m]	Dichte [g/cm ³]
XYLO	6,22	7	1,012	71,20	0,999
OXY	6,05	7	1,055	70,50	0,998

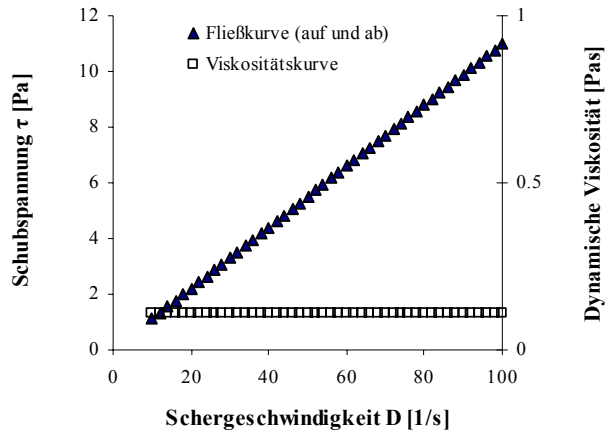


Abbildung 36: Fließkurve DSCG (50 mg/ml) in PBS, $D = 10\text{--}100\text{ 1/s}$ (siehe auch Abschnitt 4.3.1.1)

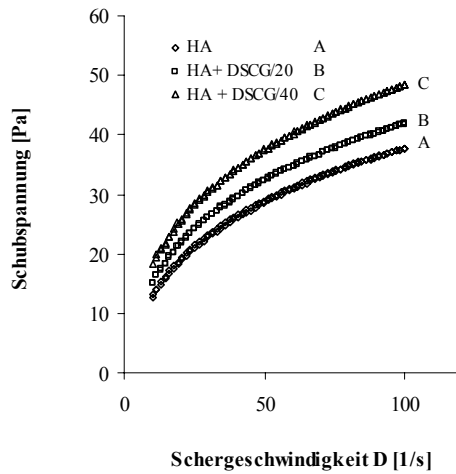


Abbildung 37: Fließkurven HA 1% (m/m) in PBS mit und ohne Zusatz von DSCG (20, 40 mg/ml), $D = 10\text{--}100\text{ 1/s}$ (siehe Abschnitt 4.3.3.4)

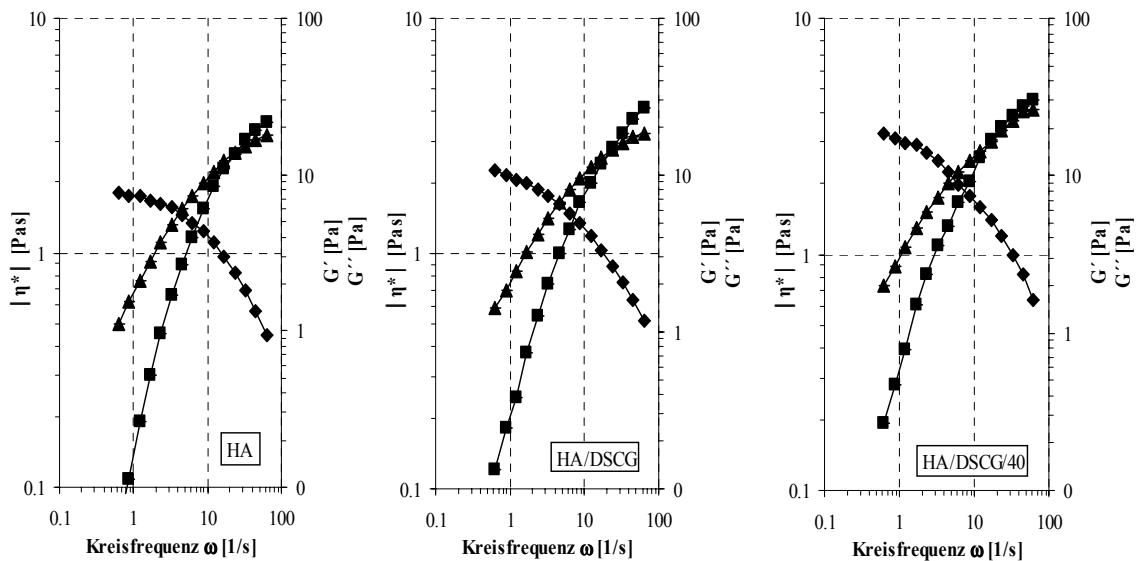


Abbildung 38: Frequenzsweep HA 1% (m/m) in PBS mit und ohne Zusatz von DSCG (20, 40 mg/ml) (siehe Abschnitt 4.3.3.4)

7.4 In-vitro-Permeationsdaten für Nephrophan®

7.4.1 Vergleichende Untersuchungen mit den Eigenrezepturen

Tabelle 44: Permeationsdaten von DSCG, XYLO und OXY (0,0039 M) durch Nephrophan® unter dem Einfluss verschiedener Formulierungsparameter (siehe Abschnitt 4.2.2, Tab. 11 bis 13)

Formulierungsparameter		$P_{app} \times 10^{-5} \text{ [cm/s]}$	$Q_{60} \text{ [}\mu\text{g]}$	$Q_{60} \text{ [%]}$
Natriumcromoglicat (0,0039 M)				
Referenz		2,78 ± 0,11	398,80 ± 39,07	6,85
Konservierungsmittel	EDTA	2,73 ± 0,09	401,25 ± 6,69	6,69
	BAC	2,66 ± 0,09	407,16 ± 14,72	6,79
	EDTA/BAC	2,75 ± 0,09	400,16 ± 33,07	6,67
Tonizität	stark hypoton	2,58 ± 0,25	410,20 ± 36,75	6,84
	schwach hypoton	2,63 ± 0,06	363,53 ± 15,60	6,06
	schwach hyperton	2,88 ± 0,11	401,70 ± 40,77	6,70
Isotonisierungsmittel	Sorbitol	2,36 ± 0,07*	340,13 ± 26,80	5,67
	Glukose	2,43 ± 0,07*	359,89 ± 21,50	6,00
	Natriumchlorid	2,46 ± 0,04*	355,32 ± 7,12	5,92
Xylometazolinhydrochlorid (0,0039 M)				
Referenz		2,79 ± 0,07	212,80 ± 11,97	6,48
Konservierungsmittel	EDTA	2,85 ± 0,06	221,47 ± 5,09	6,74
	BAC	2,73 ± 0,04	208,44 ± 6,68	6,35
	EDTA/BAC	2,89 ± 0,10	220,99 ± 14,45	6,73
Tonizität	stark hypoton	2,83 ± 0,07	200,80 ± 10,34	6,46
	schwach hypoton	2,84 ± 0,06	203,92 ± 7,33	6,50
	schwach hyperton	2,58 ± 0,04	200,54 ± 2,68	6,10
Isotonisierungsmittel	Sorbitol	2,74 ± 0,03	207,54 ± 0,39	6,32
	Glukose	2,96 ± 0,10	221,95 ± 16,61	6,76
	Natriumchlorid	2,90 ± 0,14	234,48 ± 24,44	6,75
Oxymetazolinhydrochlorid (0,0039 M)				
Referenz		2,83 ± 0,07	222,63 ± 13,65	6,41
Konservierungsmittel	EDTA	2,54 ± 0,06	201,97 ± 10,33	5,81
	BAC	2,49 ± 0,02	199,29 ± 1,66	5,74
	EDTA/BAC	2,94 ± 0,08	217,03 ± 4,56	6,25
Tonizität	stark hypoton	3,02 ± 0,11	242,51 ± 14,74	6,98
	schwach hypoton	2,51 ± 0,14	199,79 ± 22,97	5,75
	schwach hyperton	2,73 ± 0,11	208,72 ± 15,85	6,00
Isotonisierungsmittel	Sorbitol	2,73 ± 0,09	217,53 ± 14,20	6,26
	Glukose	2,73 ± 0,06	219,87 ± 10,81	6,33
	Natriumchlorid	2,75 ± 0,09	249,55 ± 15,33	6,31

* Signifikanz (ANOVA) für den Einfluss der Formulierungsparameter auf den jeweiligen Arzneistoff

7.4.2 Spezielle Untersuchungen mit DSCG

Tabelle 45: Permeationsdaten von DSCG durch Nephrophan[®] unter dem Einfluss verschiedener Formulierungsparameter

Formulierungsparameter		$P_{app} \times 10^{-5}$ [cm/s]	Q_{60} [μg]	Q_{60} [%]
Permeation von FLU, Vorinkubationsversuche mit DSCG (siehe Tab. 18 in Abschnitt 4.3.1.2)				
	ohne Vorinkubation	2,32 ± 0,06	61,61 ± 2,88	5,51
10 min	DSCG/2	2,40 ± 0,07	62,07 ± 2,85	5,53
	DSCG/10	2,35 ± 0,08	60,72 ± 2,36	5,41
	DSCG/20	2,45 ± 0,08	63,42 ± 3,20	5,65
20 min	DSCG/2	2,42 ± 0,06	62,74 ± 2,26	5,59
	DSCG/10	2,35 ± 0,14	61,14 ± 5,33	5,45
	DSCG/20	2,51 ± 0,13	64,73 ± 5,19	5,77
Einfluss von Polysorbat auf die Permeation von DSCG (siehe Tab. 20 in Abschnitt 4.3.1.3)				
DSCG (0,0039 M)				
Referenz		2,78 ± 0,11	398,80 ± 39,07	6,85
+ 0,005 % PS		2,69 ± 0,06	391,25 ± 17,99	6,52
+ 0,01 % PS		2,88 ± 0,12	387,78 ± 29,79	6,46
+ 0,1 % PS		2,69 ± 0,08	389,46 ± 29,19	6,49
+ 0,1 % EDTA		2,73 ± 0,09	401,25 ± 6,69	6,69
Vorinkubation EDTA 0,1 %		2,71 ± 0,04	390,74 ± 8,21	6,51
+ 0,01 % PS + 0,1 % EDTA		2,82 ± 0,06	399,35 ± 19,07	6,66
DSCG (0,039 M)				
Referenz		1,87 ± 0,06	2695,99 ± 88,81	5,43
+ EDTA 0,1 %		1,91 ± 0,04	2738,42 ± 163,33	4,56
+ PS 0,01 % + EDTA 0,1 %		1,86 ± 0,04	2632,97 ± 105,84	4,39
Vividrin [®]		1,41 ± 0,07*	20,27,11 ± 174,31	3,38
Einfluss des Konservierungsmittels auf die Permeation von DSCG (0,0039 M) (siehe Tab. 21 in Abschnitt 4.3.1.5)				
Referenz		2,78 ± 0,11	398,80 ± 39,07	6,85
+ Phenylethanol 0,5 %		2,79 ± 0,05	397,36 ± 20,49	6,62
+ Thiomersal 0,01 %		2,76 ± 0,07	378,88 ± 34,84	6,31
+ BAC 0,01 %		2,66 ± 0,09	407,16 ± 14,72	6,79
Vorinkubation Thiomersal		2,72 ± 0,05	387,89 ± 18,30	6,46

* signifikant zur jeweiligen Referenz (t-Test)

7.5 CMC-Bestimmungen

Die tensiometrische Bestimmung der CMC eines Tensides ist mit der Schwierigkeit verbunden, dass je nach Versuchsbedingungen unterschiedliche Ergebnisse möglich sein können. So beeinflussen Startvolumen und Startkonzentrationen des Tensides sowie die Größe des Probengefäßes die Bestimmung enorm.

Die Oberflächenspannung eines Tensides in wässriger Lösung nimmt erst mit Mizellbildung nicht mehr weiter ab, die ihrerseits erst nach vollständiger Oberflächenbelegung erfolgt. Je größer nun die aus den Abmaßen des Gefäßes resultierende Oberfläche und das Startvolumen sind, umso später wird die Mizellbildung einsetzen und somit auf die Ermittlung der CMC Einfluss nehmen.

Abbildung 39 zeigt die CMC-Bestimmung von BAC und Polysorbat 80 in Wasser und PBS. Die graphische Auswertung dieser Darstellung ist kaum möglich.

Die Konzentrationswerte der CMC, die dieser Darstellung entnehmbar sind, liegen deutlich zu niedrig. Neben der Beeinflussung durch die oben bereits genannten Parameter, ist zu bedenken, dass bei sehr niedriger Ausgangskonzentration und bei logarithmischer Zugabeweise, die resultierende Kurve zusätzlich zu kleineren Werten gestaucht wird.

Zu entnehmen ist dieser CMC-Bestimmung, dass die Verwendung eines Puffersystems auf die CMC des ionischen Tensides Benzalkoniumchlorid Einfluss nimmt.

Abbildung 40 zeigt dagegen das Ergebnis der CMC-Bestimmung mittels Pyren (↓ 5.2.1.8), die eine deutlich bessere Auswertbarkeit aufweist. Der Einfluss des verwendeten Puffers auf die CMC-Bestimmung von BAC zeigt sich auch hier. Versuche, eine Wechselwirkung von DSCG mit den Tensiden mit einem Einfluss auf die Lage der CMC nachzuweisen, scheiterten, da ein DSCG-Zusatz über 0,0025 % eine Fluoreszenzlöschung verursachte. Die Bildung des Ionenpaares DSCG/BAC lässt sich jedoch anhand der Darstellung selbst mit diesem gering konzentrierten Zusatz an DSCG erkennen.

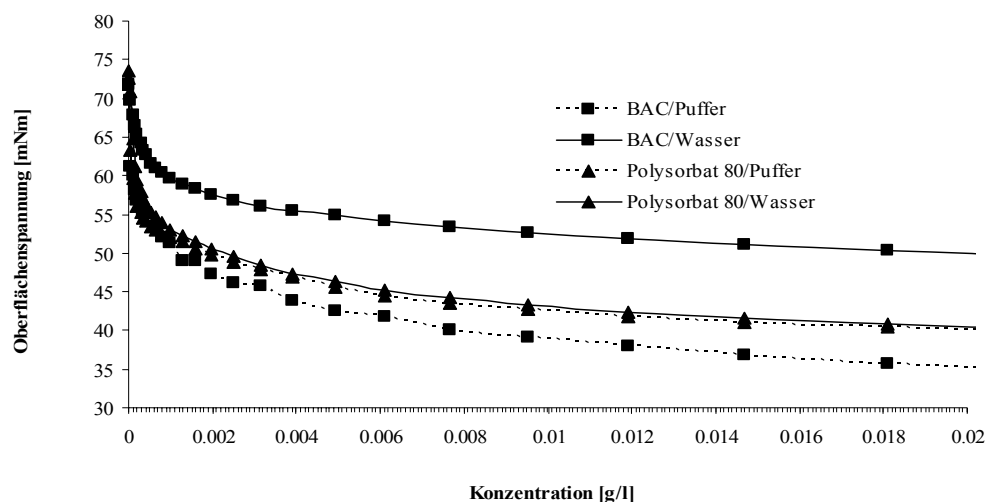


Abbildung 39: Tensiometrische CMC-Bestimmung von BAC und PS 80

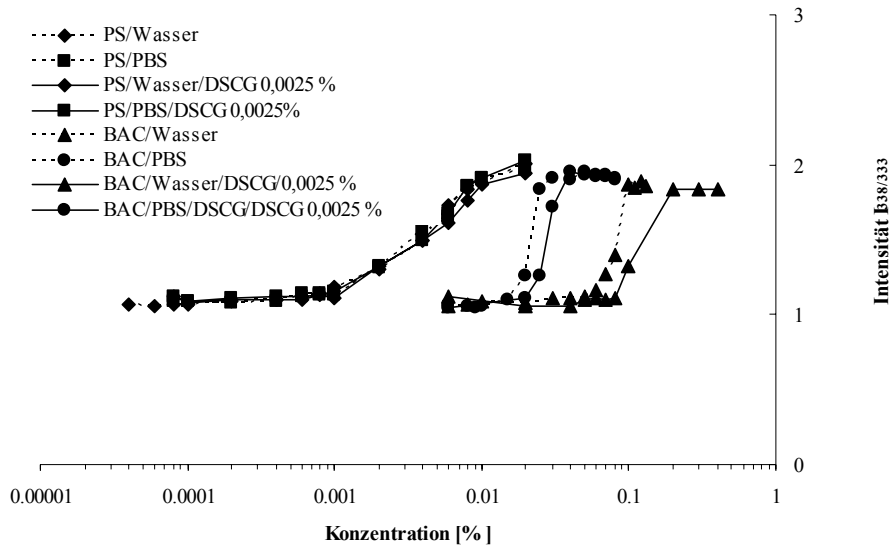


Abbildung 40: Fluorimetrische CMC-Bestimmung von BAC und PS 80: Einfluss von DSCG (0,0025 %)

7.6 Statistische Vergleiche der Mucinwechselwirkungsstudien

Tabelle 46: Statistische Vergleiche der Mucinwechselwirkungen: Vergleich von G' (siehe Tab. 30, Abschnitt 4.3.3.3)

Mucin	+ DSCG/5	+ DSCG/7,5	+ DSCG/10	+ MC	+ MC/DSCG/5	+ HA
+ DSCG/5		Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
+ DSCG/7,5	*			Nein	Nein	Nein
+ DSCG/10	*	Nein		Ja	Nein	Nein
+ MC					Ja	Ja
+ MC + DSCG/5						Nein
+ HA						
+ HA + DSCG/5	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
+ HA + DSCG/7,5	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
+ HA + DSCG/10	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Tabelle 47: Statistische Vergleiche der Mucinwechselwirkungen: Vergleich von m (siehe Tab. 30, Abschnitt 4.3.3.3)

Mucin	Mucin	+DSCG/5	+ DSCG/7,5	+ DSCG/10	+ MC	+ MC/DSCG/5	+ HA
+ DSCG/5	Ja				Ja	Ja	Nein
+ DSCG/7,5	Ja*	Ja			Ja	Ja	Ja
+ DSCG/10	Ja*	Ja	Nein		Ja	Ja	Ja
+ MC	Nein					Ja	Ja
+ MC + DSCG/5	Ja						Nein
+ HA	Ja						
+ HA + DSCG/5	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja
+ HA + DSCG/7,5	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja
+ HA + DSCG/10	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein

Ja/Nein: signifikanter Unterschied (t -Test) vorhanden (Ja) oder nicht vorhanden (Nein)

Signifikanz nicht geprüft

ANOVA: signifikanter Unterschied: *

ANOVA: signifikanter Unterschied: *

7.7 Statistische Vergleiche der Liberationsstudien

Tabelle 48: Statistischer Vergleich (t-Test) der Liberationsdaten von DSCG gegen DSCG (siehe Tab. 32 Abschnitt 4.3.3.5)

DSCG versus DSCG						
	DSCG/5	DSCG/10	M + DSCG/5	M + DSCG/10	M + DSCG/5 + HA	M + DSCG/10 + HA
DSCG/5		Ja	Ja		Ja	
DSCG/10	Ja			Ja		Ja
M + DSCG/5					Ja	
M + DSCG/10						Ja

Tabelle 49: Statistischer Vergleich (t-Test) der Liberationsdaten von OXY gegen DSCG (siehe Tab. 32 Abschnitt 4.3.3.5)

OXY versus DSCG						
	DSCG/5	DSCG/10	M + DSCG/5	M + DSCG/10	M + DSCG/5 + HA	M + DSCG/10 + HA
OXY	Ja	Ja				
+ M	Ja					
+ DSCG/5	Ja					
+ DSCG/10		Ja				
+ DSCG/5 + HA					Nein	
+ DSCG/10 + HA						Nein
+ HA			Ja	Ja	Nein	Nein

Tabelle 50: Statistischer Vergleich (t-Test) der Liberationsdaten von OXY gegen OXY (siehe Tab. 32 Abschnitt 4.3.3.5)

OXY versus OXY					
	OXY + M	+ M + DSCG/5	+ M + DSCG/10	+ M + DSCG/5 + HA	+ M + DSCG/10 + HA
OXY + M	Ja	Ja	Ja		
+ DSCG/5			Nein		
+ DSCG/5 + HA		Nein	Nein		Nein
+ DSCG/10 + HA		Nein	Nein		
+ HA	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja

Ja/Nein: signifikanter Unterschied (t-Test) vorhanden (Ja) oder nicht vorhanden (Nein)

Signifikanz nicht geprüft

8 LITERATUR

- 1 BACHERT, C., Allergic rhinitis. Pathophysiology, diagnosis, differential diagnosis and therapy, *Z. Ärztl. Fortbil. Qualitätssich.* 91, 501-505 (1997)
- 2 Wichtige Mitteilungen der Arzneimittelkommission Deutscher Apotheker, *DAZ* 138, 4016 (1998)
- 3 Wichtige Mitteilungen der Arzneimittelkommission Deutscher Apotheker, *DAZ* 142, 3630 (2002)
- 4 Wichtige Mitteilungen der Arzneimittelkommission Deutscher Apotheker, *DAZ* 142, 5228 (2002)
- 5 CHIEN, Y.W., SU, K.S.E., CHANG, S.-F., *Nasal systemic drug delivery*, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, 1989, S. 200-219
- 6 FISHER, A.N., Absorption across the nasal mucosa of animal species: Compounds applied and mechanisms involved, *Prog. Drug Metabol.* 12, (1990) 87-145
- 7 UGWOKÉ, M.I., VERBEKE, N., KINGET, R., The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 3-22 (2001)
- 8 HUSSAIN, A., HIRAI, S., BAWARSHI, R., Nasal absorption of propranolol from different dosage forms by rats and dogs, *J. Pharm. Sci.* 69, 1411-1413 (1980)
- 9 PROVASI, D., ASCENTIIS, A.D., COLOMBO, P., CATELLANI, P.L., Nasal powders of progesterone: Manufacturing and bioavailability, *Eur. J. Pharm. Bull.* 40, 223-227 (1994)
- 10 VAN CAUWENBERGE, P., BACHERT, P., PASSALACQUA, G., BOUSQUET, J., CANONICA, G.W., DURHAM, S.R., FOKKENS, W.J., HOWARTH, P.H.L., HOWARTH, V., MALLING, H.J., MYGIND, N., PASSALI, D., SCADDING, G.K., WANG, D.Y., Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. European Academy of Allergology and Clinical Immunology, *Allergy* 55, 116-134 (2000)
- 11 MELTZER, A.N., An overview of current pharmacotherapy in perennial rhinitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 1097-1100 (1995)
- 12 AIKAWA, K., MATSUMOTO, K., UDA, H., TANAKA, S., SHIMAMURA, H., ARAMAKI, Y., TSUCHIYA, S., Prolonged release of drugs from O/W emulsion and residence in rat nasal cavity, *Pharm. Drug Dev. Technol.* 3, 461-469 (1998)
- 13 SCHMIDT, M.C., PETER, H., LANG, S.R., DITZINGER, G., MERKLE, H.P., In vitro cell model to study nasal mucosal permeability and metabolism, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29, 51-79 (1998)
- 14 THEWS, G., MUTSCHLER, E., VAUPEL, P., *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999, S. 292-296, 710 ff.
- 15 SOMMER, K., *Der Mensch*, Weltbild Verlag GmbH Augsburg, 1994, S. 255 ff.
- 16 MERKUS, F.W., VERHOEF, J.C., SCHIPPER, N.G., MARTIN, E., Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29, 13-38 (1998)
- 17 JONES, N.S., CT of the paranasal sinuses: A review of the correlation with clinical, surgical and histopathological findings, *Clin. Otolaryngol.* 27, 11-17 (2002)
- 18 MUTSCHLER, E., *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001, S. 88 ff., 617 ff.
- 19 FORTH, W., HENTSCHLER, D., RUMMEL, W., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, S. 319-325
- 20 BOUSQUET, J., CHANAL, I., ALQUIE, M.C., Prevention of pollen rhinitis symptoms: Comparison of fluticasone propionate aqueous nasal spray and disodium cromoglycate aqueous nasal spray. A multicenter, double-blind, double-dummy, parallel-group study, *Allergy* 48, 327-333 (1993)
- 21 DUCHÊNE, D., PONCHEL, G., Nasal administration: A tool for tomorrow's systemic drug administration, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19, 101-122 (1993)
- 22 CORNAZ, A., BURI, P., Nasal mucosa as an absorption barrier, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40, 261-270 (1994)
- 23 CORBO, D., LIU, J.-C., CHIEN, Y.W., Characterisation of the barrier properties of mucosal membranes, *J. Pharm. Sci.* 79, 202-206 (1990)
- 24 McMARTIN, C., HUTCHINSON, L.E.F., HYDE, R., PETERS, G.E., Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity, *J. Pharm. Sci.* 76, 535-540 (1987)
- 25 KHANVILKAR, K., DONOVAN, M.D., FLANAGAN, D.R., Drug transfer through mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 173-193 (2001)

- 26 MARTIN, E., ROMEIJN, S.G., VERHORF, J.C., MERKUS, F.W.H.M., Nasal absorption of dihydroergotamine from liquid and powder formulations in rabbits, *J. Pharm. Sci.* **86**, 802-807 (1997)
- 27 LIM, S.T., FORBES, B., BERRY, D.J., MARTIN, G.P., BROWN, M.B., In vivo evaluation of novel hyaluronan/chitosan microparticulate delivery systems for the nasal delivery of gentamicin in rabbits, *Int. J. Pharm.* **231**, 73-82 (2002)
- 28 CRITCHLEY, H., DAVIS, S.S., FARRAJ, N.F., ILLUM, L., Nasal absorption of desmopressin in rats and sheep, *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 651-656 (1993)
- 29 MORIMOTO, K., MORISAKA, K., KAMADA, A., Enhancement of nasal absorption of insulin and calcitonin using polyacrylic acid gel, *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 134-136 (1984)
- 30 MERKUS, F.W.H.M., SCHIPPER, N.G.M., HERMENS, W.A.J.J., ROMEIJN, S.G., VERHOEF, J.C., Absorption enhancers in nasal drug delivery: Efficacy and safety, *J. Control. Release* **24**, 201-208 (1993)
- 31 SAKAR, M.A., Drug metabolism in the nasal mucosa, *Pharm. Res.* **9**, 1-8 (1992)
- 32 EDMAN, P., BJÖRK, E., RYDEN, L., Microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs, *J. Control. Release* **21**, 165-172 (1992)
- 33 ISHIDA, M., MACHIDA, Y., NAMBU, N., NAGAI, T., New mucosal dosage form of insulin, *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 810-816 (1981)
- 34 CASS, L.M.R., EFTHYMIPOULUS, C., BYE, A., Pharmacokinetics of zanamivir after intravenous, oral, inhaled or intranasal administration to healthy volunteers, *Clin. Pharmacokinet.* **36**, 1-11 (1999)
- 35 ALMEIDA, A.J., ALPAR, H.O., Nasal delivery of vaccines, *J. Drug Target.* **3**, 455-467 (1996)
- 36 VERHOEF, J.C., MERKUS, F.W.H.M., Nasal absorption enhancement: Relevance to nasal drug delivery, Hrsg.: DE BOER, A.G., *Drug absorption enhancement*, Harwood academic publishers Chur, 1994, S. 120 ff.
- 37 DONDETI, P., HOSSEIN, Z., NEDHAM, T.E., Bioadhesive and formulation parameters affecting nasal absorption, *Int. J. Pharm.* **127**, 115-133 (1996)
- 38 GIZURARSON, S., Animal models for intranasal drug delivery studies, *Acta Pharm. Nord.* **2**, 105-122 (1990)
- 39 ILLUM, L., Nasal delivery. The use of animal models to predict performance in man, *J. Drug. Target.* **3**, 427-442 (1995)
- 40 DONDETI, P., ZIA, H., NEEDHAM, T.E., LUZZI, L.A., Development of a new non-surgical perfusion technique for evaluation of nasal drug delivery, *Pharmazie* **49**, 505-509 (1994)
- 41 WADELL, C., BJÖRK, E., CAMBER, O., Nasal drug delivery – Evaluation of an in vitro model using porcine nasal mucosa, *Eur. J. Pharm. Sci.* **7**, 197-206 (1999)
- 42 SCHMIDT, M.C., SIMMEN, D., HILBE, M., BODERKE, P., DITZINGER, G., SANDOW, J., LANG, S., RUBAS, W., MERKLE, H.P., Validation of excised bovine nasal mucosa as in vitro model to study drug transport and metabolic pathways in nasal epithelium, *J. Pharm. Sci.* **89**, 396-406 (2000)
- 43 BORCHARDT, R.T., SMITH, P.L., WILSON, G., Models for assessing drug absorption metabolism, *Pharm. Biotechnol.* **8**, 309-323 (1996)
- 44 KISSEL, T., WERNER, U., Nasal delivery of peptides: An in vitro cell culture model for the investigation of transport and metabolism in human nasal epithelium, *J. Control. Release* **53**, 195-203 (1998)
- 45 WERNER, U., KISSEL, T., In-vitro cell culture models of nasal epithelium. A comparative histochemical investigation of their suitability for drug transport studies, *Pharm. Res.* **13**, 978-988 (1996)
- 46 BATTS, A.H., MARIOTT, C., MARTIN, G.P., BOND, S.W., GREAVES, J.L., WILSON, C.G., The use of a radiolabelled saccharin solution to monitor the effect of the preservatives thiomersal, benzalkonium chloride and EDTA on human nasal clearance, *J. Pharm. Pharmacol.* **43**, 180-185 (1991)
- 47 PETRUSON, B., Structural and functional aspects of cells in the nasal mucociliary system, *Arch. Otolaryngol.* **110**, 576-581 (1984)
- 48 MYGIND, N., ÄNGGÅRD, A., Anatomy and physiology of the nose – Pathophysiologic alterations in allergic rhinitis, *Clin. Rev. Allergy* **2**, 173-188 (1984)
- 49 SEZAKI, H., Mucosal penetration enhancement, *J. Drug Target.* **3**, 175-177 (1995)
- 50 NOACH, A.B.J., HURNI, M.A., DE BOER, A.B., BREIMER, D.D., Drug transport and its enhancement via the paracellular pathway, Hrsg.: DE BOER, A.G., *Drug absorption enhancement*, Harwood academic publishers Chur, 1994, S.291 ff.,
- 51 HOCHMAN, J., ATURSSON, P., Mechanism of absorption enhancement and tight junction regulation, *J. Control. Release* **29**, 253-267 (1994)

- 52 BORCHARDT, G., LUEBEN, H.L., DE BOER, A.G., VERHOEF, J.C., LEHR, C.-M., JUNGINGER, H.E., The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro, *J. Control. Release* **39**, 131-138 (1996)
- 53 WIKMAN-LARHED, A., ARTURSSON, P., Co-cultures of human intestinal goblet (HT29-H) and absorptive (Caco-2) cells for studies of drug and peptide absorption, *J. Pharm. Sci.* **3**, 471-183 (1995)
- 54 FREDERIKSEN, O., RÖPKE, M., HANSEN, M., CARSTENS, S., HILM, M., CHRISTENSEN, P., COLDING-JORGENSEN, A., DANIELSEN, G., Phospholipid-induced changes of the rabbit nasal mucosa in vitro, *Am. J. Physiol.* **271**, 646-655 (1996)
- 55 MARTIN, E., VERHOEF, J.C., SPIES, F., VAN DER MEULEN, J., NAGELKERKE, J.F., KOERTEN, H.K., MERKUS, F.W.H.M., The effect of methylated β -cyclodextrins on the tight junctions of the rat nasal respiratory epithelium: Electron microscopic and confocal laser scanning microscopic visualization studies, *J. Control. Release* **57**, 205-213 (1999)
- 56 PUJARA, C.P., SHAO, Z., DUNCAN, M.R., MITR, A.K., Effect of formulation variables on nasal epithelial cell integrity: Biochemical evaluations, *Int. J. Pharm.* **114**, 197-203 (1995)
- 57 DODANE, V., KHAN, M.A., MERVIN, J.R., Effect of chitosan on epithelial permeability and structure, *Int. J. Pharm.* **181**, 21-32 (1999)
- 58 CARSTENS, S., DANIELSEN, G., GULDHAMMER, B., FREDERIKSEN, O., Transport of insulin across rabbit nasal mucosa in vitro induced by didecanoyl-L- α -phosphatidylcholine, *Diabetes* **42**, 1032-1040 (1993)
- 59 BECHGAARD, E., GIZURARSON, S., JORGENSEN, L., LARSEN, R., The viability of isolated rabbit nasal mucosa in the ussing chamber, and the permeability of insulin across the membrane, *Int. J. Pharm.* **87**, 125-132 (1992)
- 60 HSIUNG, C.C., SKALAK, R., Hydrodynamic and mechanical aspects of endothelial permeability, *Biorheology* **21**, 207-221 (1984)
- 61 HOSOYA, K., KUBO, H., NATSUME, H., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y., Evaluation of enhancers to increase nasal absorption using ussing chamber technique, *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 207-221 (1994)
- 62 GIZURARSON, S., TAMURA, S., KURATA, T., Estimating tissue permeability and other bioelectrical parameters using membrane voltage and short-circuit current, *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1636-1627 (1991)
- 63 KUBO, H., HOSOYA, K., NATSUME, H., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y., In vitro permeation of several model drugs across rabbit nasal mucosa, *Int. J. Pharm.* **103**, 27-36 (1994)
- 64 COTTON, C.U., STUTTS, M.J., KNOWLES, M.R., Abnormal apical cell membrane in cystic fibrosis respiratory epithelium. An in vitro electrophysiologic analysis, *J. Clin. Invest.* **79**, 80-85 (1987)
- 65 BECHGAARD, E., JORGENSEN, L., LARSEN, R., GIZURARSON, S., CARTENSEN, J., HVASS, A., Insulin and didecanoyl-L- α -phosphatidylcholine: In vitro study of the transport through rabbit nasal mucosa, *Int. J. Pharm.* **89**, 147-153 (1993)
- 66 HOSOYA, K., KUBO, H., NATSUME, H., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y., YAMASHITA, S., The structural barrier of absorptive mucosae: Site difference of the permeability of fluorescein isothiocyanate-labelled dextran in rabbits, *Biopharm. Drug Pos.* **14**, 685-696 (1993)
- 67 SCHMIDT, M.C., RUBAS, W., MERKLE, H.P., Nasal epithelial permeation of thymotrinin (TP3) versus thymocartin (TP4): Competitive metabolism and self-enhancement, *Pharm. Res.* **17**, 200-208 (2002)
- 68 QUARISHI, M.S., JONES, N.S., MASON, J., The rheology of nasal mucus: A review, *Clin. Otolaryngol.* **23**, 403-413 (1998)
- 69 MIDDLETON, P.G., POLLARD, K.A., WHEATLEY, J.R., Hypertonic saline alters ion transport across the human airway epithelium, *Eur. Respir. J.* **17**, 195-199 (2001)
- 70 JUNGINGER, H.E., LEHR, C.-M., Bioadhäsive Arzneistoffabgabesysteme und Arzneiformen für perorale und rektale Anwendung, *DAZ* **130**, 791-797 (1990)
- 71 DUCHÊNE, D., TOUCHARD, F., PEPPAS, N.A., Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration, *Drug Develop. Ind. Pharm.* **14**, 283-318 (1988)
- 72 LEHR, C.-M., Bioadhäsion und bioadhäsive Arzneiformen, Hrsg.: MÜLLER, R.H., *Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1998
- 73 MADSEN, F., EBERTH, K., SMART, J.D., A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: The effect of mucoadhesive type and concentration, *J. Control. Release* **50**, 167-178 (1998)
- 74 WOODLEY, J., Bioadhesion: New possibilities for drug administration?, *Clin. Pharmacokinet.* **40**, 77-84 (2001)

- 75 MADSEN, F., In-vitro evaluation of mucoadhesion, Ph.D.-thesis, The Royal Danish School of Pharmacy, Copenhagen, 1995
- 76 MORTAZAVI, S.A., SMART, J.D., An in vitro method for assessing the duration of mucoadhesion, *J. Control. Release* **31**, 207-212 (1994)
- 77 PEPPAS, N.A., Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues, *J. Control. Release* **2**, 257-275 (1985)
- 78 HERZFELDT, C.-D., KREUTER, J., Grundlagen der Arzneiformenlehre, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1999, S. 26 ff., 136, 159, 275 ff. 387 ff.
- 79 LEHR, C.-M., BODDE, H.E., BOUWSTRA, A., JUNGINGER, H.E., A Surface energy analysis of mucoadhesion. II: Prediction of mucoadhesive performance by spreading coefficients, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1**, 19-30 (1993)
- 80 SAMRT, J.D., KELLAWAY, I.W., WORTHINGTON, H.E.C., An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.* **36**, 295-299 (1984)
- 81 JABBARI, E., WISNIEWSKI, N., PEPPAS, N.A., Evidence of mucoadhesion by chain interpenetration at a poly(acrylic acid)/mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy, *J. Control. Release* **26**, 99-108 (1993)
- 82 CAMELLA, C., BONFERONI, M.C., ROSSI, S., FERRARI, F., Rheological and tensile tests for the assessment of polymer-mucin interactions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **40**, 213-217 (1994)
- 83 AHUJA, A., KHAR, R.K., ALI, J., Mucoadhesive drug delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **23**, 489-515 (1997)
- 84 LEHR, C.-M., SCHNURRER, J., Mucoadhesive properties of the mussel adhesive protein, *Int. J. Pharm.* **141**, 251-256 (1996)
- 85 BERNKOP-SCHNÜRCH, A., FREUDL, J., Comparative in vitro study of different chitosan-complexing agent conjugates, *Pharmazie* **54**, 369-371 (1999)
- 86 BLANC-FUENTE, H., VILA-DORRIO, B., ANGUIANO-IGEA, S., OTERO-ESPINAR, K., BLANCO-MEDEZ, J., Tanned leather: A good model for determining hydrogels bioadhesion, *Int. J. Pharm.* **138**, 103-112 (1996)
- 87 ROSSI, S., BONFERONI, M.C., FERRARI, F., BERTONI, M., CAMELLA, C., Charakterization of mucin interaction with three viscosity grades of sodium carboxymethylcellulose. Comparison between rheological and tensile testing, *Eur. J. Pharm. Sci.* **4**, 189-196 (1996)
- 88 HASSAN, E.E., GALLO, J.M., A simple rheological method for the in vitro assessment on mucin-polymer bioadhesive bond strength, *Pharm. Res.* **7**, 491-495 (1990)
- 89 OECHSNER, M., *Bipolymere Zubereitungen auf Polyacrylsäure-Basis zur Anwendung in der Therapie der Keratoconjunctivitis sicca und des Glaukoms*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1998
- 90 ROSSI, S., BONFERONI, M.C., CAMELLA, C., IRONI, L., TENTONI, S., Model-based interpenetration of creep profiles for the assessment of polymer-mucin interaction, *Pharm. Res.* **16**, 1456-1463 (1999)
- 91 NAKAMURA, F., OHTA, R., MACHIDA, Y., NAGAI, T., In vitro and in vivo nasal mucoadhesion of some water-soluble polymers, *Int. J. Pharm.* **134**, 173-181 (1996)
- 92 MACCHIONE, M., KING, M., LORENZI-FILHO, G., GUIMARAES, E.T., ZIN, W.A., BÖHM, G.M., SALDIVA, P.H.N., Rheological determinants of mucociliary transport in the nose of the rat, *Resp. Physiol.* **99**, 165-172
- 93 RHEE, C., MAJIMA, Y., CHO, J., ARIMA, S., MIN, Y., SAKAKURA, Y., ARCH, H., Effects of mucokinetic drugs on rheological properties of reconstituted human nasal mucus, *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **125**, 101-105 (1999)
- 94 ASPDEN, T.J., MASON, J.D.T., JONES, M.S., LOWE, J., SKAUGRUD, Ø., ILLUM, L., Chitosan as a nasal delivery system: The effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers, *J. Pharm. Sci.* **86**, 509-513 (1997)
- 95 *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Band 9, Stoffe A-D, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1993, S. 1108-1110
- 96 HARTKE, K., HARTKE, H., MUTSCHLER, E., RÜCKER, G., WICHTL, M. (Hrsg.), *DAB-10 Kommentar für Studierende*, Band 3, Monographien A-Z, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1991, N 18
- 97 SHAPIRO, G., KÖNIG, P., Cromolyn sodium: A review, *Pharmacotherapy* **5**, 165-170 (1985)
- 98 HUESTON, C.K., Mast cell stabilizers, *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **107**, 841-844 (1992)

- 99 OCHOA DE ASPURU, E., LOURDES ZATON, A.M., Effect of the antiallergic drug sodium cromoglycate and various derivatives on alkaline phosphatase, *J. Enzyme Inhib.* **8**, 87-95 (1994)
- 100 OCHOA DE ASPURU, E., LOURDES ZATON, A.M., Effect of the antiallergic drug disodium cromoglycate on phosphodiesterase activity, *J. Enzyme Inhib.* **10**, 135-139 (1996)
- 101 WANG, L., CORREIA, I., BASU, S., THEOHARIDES, T.C., Ca^{2+} and phorbol ester effect on the mast cell phosphoprotein induced by cromolyn, *Eur. J. Pharm.* **371**, 241-249 (1999)
- 102 RATNER, P.H., EHRLICH, P.M., FINEMANN, S.M., MELTZER, E.O., SKONER, D.P., Use of intranasal cromolyn sodium for allergic rhinitis, *Mayo Clin. Proc.* **77**, 350-354 (2002)
- 103 MOSS, G.F., JONES, K.M., RITCHIE, J.T., COX, J.S.G., Distribution and metabolism of disodium cromoglycate in rats, *Tox. Appl. Pharmacol.* **17**, 691-698 (1970)
- 104 *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Band 9, Stoffe E-O, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1993, S. 1277-1279
- 105 HARTKE, K., HARTKE, H., MUTSCHLER, E., RÜCKER, G., WICHTL, M. (Hrsg.), *DAB-10 Kommentar für Studierende*, Band 3, Monographien M-Z, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1991, O 17
- 106 *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Band 9, Stoffe P-Z, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1993, S. 1217-1220
- 107 DEITMER, T., SCHEFFLER, R., The effect of different preparations of nasal decongestants on ciliary beat frequency in vitro, *Rhinology* **31**, 151-153 (1993)
- 108 INGELS, K.J.A.O., MEEUWSEN, F., GRAAMANS, K., HUIZING, E.H., Influence of sympathetic and parasympathetic substances in clinical concentrations on human nasal ciliary beat, *Rhinology* **30**, 149-160 (1992)
- 109 GRAF, P., ENERDAL, J., HALLEN, H., Ten days use of oxymetazoline nasal spray with or without benzalkonium chloride in patients with vasomotor rhinitis, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **125**, 1128-1132 (1999)
- 110 GRAF, P., Adverse effects of benzalkonium chloride on the nasal mucosa: Allergic rhinitis and rhinitis medicamentosa, *Clin. Ther.* **21**, 1749-1755 (1999)
- 111 *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Band 9, Stoffe, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1993, S. 414-416
- 112 BERNSTEIN, I.L., Is the use of benzalkonium chloride as a preservative for nasal formulations a safety concern? A cautionary note based on compromised mucociliary transport, *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 39-44 (2000)
- 113 *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Band 9, Stoffe E-O, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1993, S. 5 ff.
- 114 RIMPLER, H. (Hrsg.), *Biogene Arzneistoffe*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1999, S. 129 ff.
- 115 CRATER, D.L., VAN DE RIJN, I., Hyaluronic acid synthesis operon (has) expressions in group A streptococci, *J. Biol. Chem.* **31**, 18452-18458 (1995)
- 116 SINTZEL, M.B., BERNATCHEZ, S.F., TABATABAY, C., GURNY, R., Biomaterials in ophthalmic drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **42**, 358-374 (1996)
- 117 RYDEN, L., EDMAN, P., Effect of polymers and microspheres on the nasal absorption of insulin in rats, *Int. J. Pharm.* **83**, 1-10 (1992)
- 118 DÖPPENSCHMIDT, S., *Entwicklung und Validierung analytischer Methoden zur Bestimmung verschiedener Glucocorticoide in Humanplasma und Humanserum*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1996
- 119 KROMIDAS, S. (Hrsg.), *Handbuch der Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim, 2000
- 120 International Conference on Harmonisation (ICH) of technical requirements or registration of pharmaceuticals for human use: *Guideline on validation of analytical procedures: Methodology*, by the IHC Sterling committee, IFPMA, Switzerland, (1996)
- 121 HARTMANN, C., SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, D.L., MCDOWALL, R.D., Validation of bioanalytical chromatographic methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 193-218 (1998)
- 122 GOTTWALD, W. (Hrsg.), *RP-HPLC für Anwender*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1993
- 123 LINGEMANN, H., MUNSTER, H.A., BEYNEN, J.H., UNDERBERG, W.J., HULSHOFF, A., High-performance liquid chromatographic analysis of basic compounds on non-modified silica gel and aluminium oxide with aqueous solvent mixtures, *J. Chromatogr.* **21**, 261-274 (1986)

- 124 HOFFMANN, T.J., THOMPSON, R.D., SEIFERT, J.R., Determination of the nasal decongestant, oxymetazoline hydrochloride, in pharmaceutical formulations by HPLC, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **15**, 743-757 (1989)
- 125 Prüfanweisung zur Gehaltsbestimmung von Xylometazolin-HCl, ct-Arzneimittel, 1997
- 126 Reviewer guideline: *Validation of chromatographic methods*, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration, 1994
- 127 LEE, Y.C., CHAN, C.C., System suitability tests for quantitative chromatography methods, *Laboratory-Gazette Edition Band 4*, 1999, S. 7 ff.
- 128 NG, L.L., Reversed-phase liquid chromatographic determination of cromolyn sodium in drug substance and select dosage forms, *J. AOAC Int.* **77**, 1689-1694 (1994)
- 129 ASWANIA, O.A., CORLETT, S.A., CHRYSTYN, H., Development and validation of an ion-pair liquid chromatographic method for the quantification of sodium cromoglycate in urine following inhalation, *J. Chrom. B Biomed. Sci. Appl.* **690**, 373-378 (1997)
- 130 YOSHIMI, A., HASHIZUME, H., KITAGAWA, M., NISHIMURA, K., KAKEYA, N., Characteristics of 1,3-bis-(2-ethoxycarbonylchromon-5-yloxy)-2-((S)-lysiloxy)propane dihydrochloride (N-556), a prodrug for the oral delivery of disodium cromoglycate, in absorption and excretion in rats and rabbits, *Pharmacobiodyn.* **15**, 681-686 (1992)
- 131 LIST, P.H. (Hrsg.), *Arzneiformenlehre: Ein Lehrbuch für Pharmazeuten*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1985, S. 442
- 132 BOMMER, R., Latest advances in nasal drug-delivery technology, *Med. Device Technol.* **5**, 22-28 (1999)
- 133 SIEFERT, B., *Einfluß von Cyclodextrin auf die Löslichkeit und okulare Verfügbarkeit von Pilocarpin-HCl bzw. Thalidomid*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1998
- 134 LEUENBERGER, H. (Hrsg.), *Martin Physikalische Chemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2002, S. 355 ff., 479 ff., 561 ff.
- 135 UCHIDA, N., YOSHIE, M., NAKAGAKI, M., NAGAI, T., Influence of bile salts on the permeability of insulin through the nasal mucosa of rabbits in comparison with dextran derivatives, *Int. J. Pharm.* **74**, 95-103 (1991)
- 136 BERNDT, S.M., *Entwicklung und Charakterisierung galenischer Formulierungen zur potentiellen nasalen Anwendung von Androstendion und Levodopa*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 2000
- 137 LANG, S., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., PERRIARD, J.-C., SCHMIDT, M.C., MERKLE, H.P., Permeation and pathways of human calcitonin (hct) across excised bovine nasal mucosa, *Peptides* **19**, 599-607 (1998)
- 138 BATTS, A.H., MARIOTT, G.P., WOOD, C.F., BOND, S.W., The effect of some preservatives used in nasal preparations on the mucus and ciliar components of mucociliary clearance, *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 145-151 (1990)
- 139 REARDON, P., WALL, A.D., HART, T.K., SMITH, P.L., GOCHOCO, C.H., Lack of effect of ammonium glycyrrhizinate on the morphology of ovine nasal mucosa in vitro, *Pharm. Res.* **10**, 1301-1307 (1993)
- 140 ANDERBERG, E.K., ARTURSSON, P., Epithelial transport of drugs in cell culture. VIII: Effects of sodium dodecyl sulfate on cell membrane and tight junction permeability in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *J. Pharm. Sci.* **82**, 392-398 (1993)
- 141 CLAUSEN, A.E., BERNKOP-SCHNÜRCH, A., Thiolated carboxymethylcellulose: In vitro evaluation of its permeation enhancing effect on peptide drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **51**, 25-32 (2001)
- 142 LINDMARK, T., KIMURA, Y., ARTURSSON, P., Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells, *J. Pharm. Exp. Ther.* **284**, 362-369 (1998)
- 143 HUSSAIN, A.A., Mechanism of nasal absorption of drugs, *Prog. Clin. Biol. Res.* **314**, 183-189 (1989)
- 144 CORBO, D.C., LUI, J.-C., CHIEN, Y.W., Drug absorption through mucosal membranes: Effect of mucosal route and penetrant hydrophilicity, *Pharm. Res.* **6**, 848-852 (1989)
- 145 HUSSAIN, A.A., Intranasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 39-49 (1998)
- 146 ROJANASAKUL, Y., WANG, L.-Y., BHAT, M., GLOVER, D.D., MALANGA, C.J., MA, J.K.H., The transport barrier of epithelia: A comparative study on membrane permeability and charge selectivity in the rabbit, *Pharm. Res.* **9**, 1029-1034 (1992)
- 147 GRASS, G.M., WOOD, R.W., ROBINSON, J.R., Effects of calcium chelating agents on corneal permeability, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **26**, 110-113 (1985)

- 148 LIU, D.-Z., ELCLUYSE, E.L., THAKKER, D.R., Dodecylphosphocholine-mediated enhancement of paracellular permeability and cytotoxicity in Caco-2 cell monolayers, *J. Pharm. Sci.* **88**, 1161-1168 (1999)
- 149 KOTZE, A.F., LUEBEN, H.L., DE BOER, A.G., JUNGINGER, H.E., Chitosan for enhanced intestinal permeability: Prospects for derivatives in neutral and basic environment, *Eur. J. Pharm. Sci.* **7**, 145-151 (1998)
- 150 QUAN, Y., HATTORI, K., LUNDBORG, E., FUJITA, T., MURAKAMI, M., MURANISHI, S., YAMAMOTO, A., Effectiveness and toxicity of various absorption enhancers using Caco-2 cell monolayers, *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 615-620 (1998)
- 151 MARTTIN, E., VERHOEF, J.C., ROMELJN, S.G., ZWART, P., MERKUS, F.W.H.M., Acute histopathological effects of benzalkonium chloride and absorption enhancers on rat nasal epithelium in vivo, *Int. J. Pharm.* **141**, 151-160 (1996)
- 152 EICHMAN, J.D., ROBINSON, J.R., Mechanistic studies on effervescent-induced permeability enhancement, *Pharm. Res.* **15**, 925-930 (1998)
- 153 DONOVAN, M.D., ROBINSON, J.R., AMIDON, G.L., The molecular weight dependence on nasal absorption: The effect of absorption enhancers, *Pharm. Res.* **7**, 808-815 (1990)
- 154 WILSON, C.G., TOMLINSON, E., DAVIS, S.S., OLEJNIK, O., Altered ocular absorption and disposition of sodium cromoglycate upon ion-pair and complex formation with dodecylbenzyltrimethylammonium chloride, *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 749-753 (1981)
- 155 PERESWETOFF-MORATH, L., EDMAN, P., Influence of osmolarity on nasal absorption of insulin from the thermogelling polymer ethyl(hydroxyethyl)cellulose, *Int. J. Pharm.* **125**, 205-213 (1995)
- 156 SULEYMANIAN, M.A., BAUMGARTEN, C.M., Osmotic gradient-induced water permeation across the sarcolemma of rabbit ventricular myocytes, *J. Gen. Physiol.* **107**, 503-514 (1996)
- 157 SALOMON, A.K., Water channels across the red blood cell and other biological membranes, *Methods Enzymol.* **173**, 192-222 (1989)
- 158 BJARNASON, I., MACPHERSON, A., HOLLANDER, D., Intestinal permeability: An overview, *Gastroenterology* **108**, 1566-1581 (1995)
- 159 VOIGT, R. (Hrsg.), *Pharmazeutische Technologie*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2000, S. 40 ff., 82 ff.
- 160 ROMELJN, S.G., VERHOEF, C.J., MARTTIN, E., MERKUS, F.W.H.M., The effect of nasal drug formulations on ciliary beating in vitro, *Int. J. Pharm.* **135**, 137-145 (1996)
- 161 MAITANI, Y., UCHIDA, N., NAKAGAKI, M., NAGAI, T., Effect of bile salts on the nasal mucosa: membrane potential measurement, *Int. J. Pharm.* **69**, 21-27 (1991)
- 162 POHL, E.E., KRYLOV, A.V., BLOCK, M., POHL, P., Changes of membrane potential profile induced by verapamil and propranolol, *Biochim. Biophys. Acta* **1373**, 170-178 (1998)
- 163 NATSUME, H., IWATA, S., OHTAKE, K., MIYAMOTO, M., YAMAGUCHI, M., HOSOYA, K., KOBAYASHI, D., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y., Screening of cationic compounds as an absorption enhancer for nasal drug delivery, *Int. J. Pharm.* **185**, 1-12 (1999)
- 164 MARTTIN, E., VERHOEF, J.C., ROMELJN, S.G., MERKUS, F.W.H.M., Effects of absorption enhancer on rat nasal epithelium in vivo: Release of marker compounds in the nasal cavity, *Pharm. Res.* **12**, 1151-1157 (1995)
- 165 KRISHNAMOORTHY, R., WOLKA, A.M., SHAO, Z., MITRA, A.K., Cyclodextrins as mucosal absorption promoters. IV: Evaluation of nasal mucotoxicity, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **41**, 296-301 (1995)
- 166 ASPDEN, T.J., ILLUM, L., SKAUGRUD, Ø., Chitosan as a nasal delivery system: Evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models, *Eur. J. Pharm. Sci.* **4**, 23-31 (1996)
- 167 LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, P.J., *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- 168 VEJDELEK, Z.J. (Hrsg.), *Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen*, Gustav Fischer Verlag Jena, 1976
- 169 SCHUPPAN, J., *Theorie und Messmethoden in der Konduktometrie*, Akademie-Verlag Berlin, 1980, S. 20 ff.
- 170 GLASER, R. (Hrsg.), *Biophysik*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1986, S.300 ff.
- 171 KARLSON, P. (Hrsg.), *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1988, S. 297 ff.

- 172 COX, J.S.G., WOODWARD, G.D., MCCRONE, W.C., Solid-state chemistry of cromolyn sodium, *J. Pharm. Sci.* **60**, 1458-1465 (1971)
- 173 RICHTER, H.J., BÖHM, M. (Hrsg.), *Pharmazeutisches Lexikon*, Verlag Volk und Wissen Berlin, 1989
- 174 BAUER, K.H., FRÖMMING, K.-H., FÜHRER, C. (Hrsg.), *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999
- 175 CHAMPION, J.V., MEETEN, G.H., Conformation of sodium cromolyn in aqueous solution using light scattering and magnetic birefringence, *J. Pharm. Sci.* **62**, 1589-1595 (1973)
- 176 HAMODRAKAS, S., GEDDES, A.J., SHELDRIK, B., X-ray analysis of disodium cromoglycate, *J. Pharm. Pharmacol.* **26**, 54-56 (1974)
- 177 SAHA, P., KOU, J.H., Effect of solubilizing excipients on permeation of poorly water-soluble compounds across Caco-2 cell monolayers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 403-411 (1990)
- 178 ATTIGA, S.A., ELEY, D.D., HEY, M.J., A nuclear magnetic relaxation study of bound water in solutions of disodium cromoglycate, *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 387-391 (1979)
- 179 JEPSEN, M., GRAHAM, S., KARP, P.H., ZABNER, J., Effect of topical nasal pharmaceuticals on sodium and chloride transport by human airway epithelia, *Am. J. Rhinol.* **14**, 405-409 (2000)
- 180 LUEBEN, H.L., LEEUW, B.J., LANGEMEYER, M.W.E., DE BOER, A.G., VERHOEF, J.C., JUNGINGER, H.E., Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. IV: Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo, *Pharm. Res.* **13**, 1668-1672 (1996)
- 181 SCHIPPER, N.G.M., VERHOEF, J., ROMELIJN, S.G., MERKUS, F.W.H.M., Absorption enhancers in nasal insulin delivery and their influence on nasal ciliary functioning, *J. Control. Release* **21**, 173-186 (1992)
- 182 REARDON, P., GOCHOCO, C.H., AUDUS, K.L., WILSON, G., SMITH, P.L., In vitro nasal transport across ovine mucosa: Effects of ammonium glycyrrhizinate on electrical properties and permeability of growth hormone releasing peptide, mannitol and lucifer yellow, *Pharm. Res.* **10**, 553-561 (1993)
- 183 DONOVAN, M.D., FLYNN, G.L., AMIDON, G.L., Absorption of polyethylene glycols 600 through 2000: The molecular weight dependence of gastrointestinal and nasal absorption, *Pharm. Res.* **7**, 863-868 (1990)
- 184 EVRARD, D., TOUITOU, E., KOLUSHEVA, S., FISHOV, Y., JELINEK, R., A new colorimetric assay for studying and rapid screening of membrane penetration enhancers, *Pharm. Res.* **18**, 943-949 (2001)
- 185 IRWIN, W.J., DWIVEDI, A.K., HOLBROOCK, P.A., DEY, M.J., The effect of cyclodextrins on the stability of peptides in nasal enzymatic systems, *Pharm. Res.* **11**, 1698-1703 (1994)
- 186 MAITANI, Y., ISHIGAKI, K., TAKAMURA, K., NAGAI, T., In vitro nasal transport across rabbit mucosa: Effect of oxygen bubbling, pH and hypertonic pressure on permeability of lucifer yellow, diazepam and 17- β -estradiol, *Int. J. Pharm.* **146**, 11-19 (1997)
- 187 PAHL, M.H. (Hrsg.), *Praktische Rheologie der Elastomere und Kunststoffe*, VDI-Verlag GmbH Düsseldorf, 1991, S. 10 ff., 136 ff.
- 188 STETTIN, H., private Korrespondenz
- 189 SCHRAMM, G. (Hrsg.), *Einführung in Rheologie und Rheometrie*, Gebrüder HAAKE GmbH Karlsruhe, 1995, S. 10 ff., 156 ff.
- 190 METZGER, T. (Hrsg.), *Ein kleiner Rheologiekurs*, PHYSIKA Messtechnik GmbH Stuttgart, 1992
- 191 GEHM, L. (Hrsg.), *Rheologie*, Vincentz Verlag Hannover, 1998, S. 29 ff. 45 ff.
- 192 WELIN-BERGER, K., NEELISSEN, J.A.M., BERGENSTAHL, B., The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound, *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**, 103-111 (2001)
- 193 LUDWIG, A., VAN OTEGHEM, M., Evaluation of sodium hyaluronate as viscous vehicle for eye drops, *J. Pharm. Belg.* **13**, 391-397 (1989)
- 194 PRITCHARD, K., LANSLEY, A.B., MARTIN, G.P., HELLIWELL, M., MARRIOTT, C., BENEDETTI, L.M., Evaluation of the bioadhesive properties of hyaluronan derivatives: Detachment weight and mucociliary transport rate studies, *Int. J. Pharm.* **129**, 137-145 (1996)
- 195 OZSOY, Y., TUNCEL, T., CAN, A., AKEV, N., BIRTEKSOZ, S., GERCEKER, A., In vivo studies on nasal preparations of ciprofloxacin hydrochloride, *Pharmazie* **55**, 607-609 (2000)
- 196 DE ANDRES-SANTOS, A.I., VELASCO-MARTIN, A., HERNANDEZ-VELASCO, E., MARTIN-GIL, J., MARTIN-GIL, F.J., Thermal behaviour of aqueous solutions of sodium hyaluronate from different commercial sources, *Thermoch. Acta* **242**, 153-160 (1994)
- 197 Produktinformation Pronova Biopolymer, Norderstedt

- 198 LARHED-WIKMAN, A., ARTURSSON, P., GRASJÖ, B., BJÖRK, E., Diffusion of drugs in native and purified gastrointestinal mucus, *J. Pharm. Sci.* **86**, 660-665 (1997)
- 199 BHAT, P.G., FLANAGAN, M.D., The limiting role of mucus in drug absorption: Drug permeation through mucus solution, *Int. J. Pharm.* **126**, 179-187 (1995)
- 200 KEIPERT, S., FEDDER, J., BÖHM, A., HANKE, B., Interactions between cyclodextrins and pilocarpine – As an example of a hydrophilic drug, *Int. J. Pharm.* **142**, 153-162 (1996)
- 201 PASSALI, D., BELLUSSI, L., LAURIELLO, M., The rheological characteristics of nasal mucus in patients with rhinitis, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **252**, 348-352 (1995)
- 202 BATTS, A.H., MARIOTT, C., MARTIN, G.P., BOND, S.W., The effect of some preservatives used in nasal preparations on mucociliary clearance, *J. Pharm. Pharmacol.* **41**, 156-159 (1988)
- 203 STOLL, A.J., The effect of antiallergic intranasal formulations on ciliary beat frequency of human nasal epithelium in vitro, *Allergy* **53**, 986-989 (1998)
- 204 HERMENS, W.A.J.J., MERKUS, F.W.H.M., Nasale Arzneimittel: Der Einfluß von Arzneimitteln auf die Bewegung nasaler Flimmerhaare, *DAZ* **130**, 2411-2415 (1990)
- 205 SAKETKHOO, K., YERGIN, B.M., JANUSZKIEWICZ, A., KOVITZ, K., SACKNER, M.A., The effect of nasal decongestants on nasal mucus velocity, *Am. Rev. Resp. Dis.* **118**, 251-254 (1978)
- 206 MORIMOTO, K., YAMAGUCHI, H., IWAKURA, Y., MORISAKA, K., OHASHI, Y., NAKAI, Y., Effects of viscous hyaluronate-sodium solutions on the nasal absorption of vasopressin and an analogue, *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 134-136 (1991)
- 207 PERESWETOFF-MORATH, L., BJURSTROM, S., KHAN, R., DAHLIN, M., EDMANN, P., Toxicological aspects of the use of dextran microspheres and thermogelling(hydroxyethyl)cellulose (EHEC) as nasal drug delivery systems, *Int. J. Pharm.* **128**, 9-21 (1996)
- 208 SU, X.Y., MATTERN, C., HÄCKER, R., LI WAN PO, A., Does sea-water made isotonic affect ciliary beat frequency?, *Int. J. Pharm.* **123**, 47-51 (1995)
- 209 HERMENS, W.A.J.J., MERKUS, F.W.H.M., Nasale Arzneimittel: Der Einfluss von Arzneimitteln auf die Bewegung nasaler Flimmerhaare, *DAZ* **130**, 2411-2415 (1990)
- 210 VAN DE DONK, H.J.M., HEUVEL, A.G.M., ZUIDEMA, J., MERKUS, F.W.H.M., The effects of nasal drops and their additive on human nasal mucociliary clearance, *Rhinology* **20**, 127-137 (1982)
- 211 LEONE-BAY, A., LEIPOLD, H., SARUBBI, D., VARIANO, B., RIVERA, T., BAUGHMAN, R.A., Oral delivery of sodium cromolyn: Preliminary studies in vivo and in vitro, *Pharm. Res.* **13**, 222-226 (1996)
- 212 ASWANIA, O.A., CORLTT, S.A., CHRYSTYN, H., Relative bioavailability of sodium cromoglycate to the lung following inhalation, using urinary excretion, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **47**, 613-618 (1999)
- 213 LEE, V.H.-L., SWARBRICK, J., STRATFORD, R.E., MORIMOTO, K.W., Disposition of topically applied sodium cromoglycate in the albino rabbit eye, *J. Pharm. Pharmacol.* **35**, 445-450 (1983)
- 214 FISHER, A.N., BROWN, K., DAVIS, S.S., PARR, G.D., SMITH, D.A., The nasal absorption of sodium cromoglycate in the albino rat, *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 38-41 (1985)
- 215 MAYOR, S.H., ILLUM, L., Investigation of the effect of anaesthesia on nasal absorption of insulin in rats, *Int. J. Pharm.* **149**, 123-129 (1997)
- 216 ILLUM, L., FARRAJ, N.F., DAVIS, S.S., JOHANSEN, B.R., DAVIS, S.S., Investigation of the nasal absorption of biosynthetic human growth hormone in sheep: Use of a bioadhesive microsphere delivery system, *Int. J. Pharm.* **63**, 207-211 (1990)
- 217 WOLFF, R.K., ALLEN, D.L., HUGHES, B.L., OSIER, M., DORATO, M.A., Nasal clearance in rhesus monkeys, *J. Aerosol. Med.* **6**, 111-119 (1993)
- 218 PFEIFER, S., PFLEGEL, P., BORCHERT, H.-H. (Hrsg.), *Biopharmazie*, Ullstein/Mosby GmbH & CoKg Berlin, Wiesbaden, 1995, S. 87 ff.
- 219 KATO, Y., MURAKI, K., FUJITAKA, M., SAKURA, N., UEDA, K., Disodium cromoglycate use in children and adolescents with asthma: Correlation between plasma concentrations and protective effects for various inhalation methods, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **83**, 553-558 (1999)
- 220 DOLDER, R. (Hrsg.), *Ophthalmika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1990, S. 243-244
- 221 GREAVES, J.L., WILSON, C.G., Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems, *Adv. Drug Del. Rev.* **11**, 349-383 (1993)
- 222 SNIBSON, G.R., GREAVES, J.L., SOPER, J.L., PRYDAL, J.I., WILSON, C.G., BRON, A.T., Precorneal residence times of sodium hyaluronate solutions studied by quantitative gamma scintigraphy, *Eye* **4**, 594-602 (1990)

-
- 223 SNIBSON, G.R., GREAVES, J.L., SOPER, B., TIFFANY, J.M., WILSON, C.G., BRON, A.T., Ocular surface residence times of artificial tear solutions, *Cornea* 11, 288-293 (1992)
- 224 SAETTONE, M.F., CHETONI, P., TORRACCA, M.T., BURGALASSI, S., GIANNACCINI, B., Evaluation of mucoadhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid, *Int. J. Pharm.* 51, 203-212 (1989)
- 225 KANO, S., HIROSE, T., NISHIMA, S., Change in osmolarity of disodium cromoglycate solution and protection against exercise-induced bronchospasm in children with asthma, *Eur. J. Respir.* 9, 1891-1895 (1996)
- 226 ASPDEN, T., ILLUM, L., SKAUGRUD, Ø., The effect of chronic nasal application of chitosan solutions on cilia beat frequency in guinea pigs, *Int. J. Pharm.* 153, 137-146 (1997)
- 227 HARDY, J.G., LEE, S.W., WILSON, C.G., Intranasal drug delivery by spray and drops, *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 294-297 (1985)
- 228 *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Band 2, Methoden, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1993, S. 761
- 229 LECHNER, M.D. (Hrsg.), *D'Ans Lax – Taschenbuch für Chemiker und Physiker*, Band 1, Physikalisch-chemische Daten, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1992, S. 476
- 230 JONES, M.-C., LEROUX, J.C., Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48, 101-111 (1999)
- 231 GOLANDER, Y., DE WITTE, W.J., Analytical profiles of drug substances 14, 1985, S. 135 ff.
- 232 SIEBENBRODT, I., *Untersuchungen zur Verfügbarkeitsoptimierung von Ophthalmika*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1990

LEBENS LAUF

Name	Sigrun Krase
geboren am:	15. Mai 1974 in Neustrelitz
Eltern:	Wilfried Norbert Helmut Krase, Lehrer Margot Krase, geb. Baumann, Lehrer
Adresse:	Goyastr. 11 13086 Berlin
Familienstand:	ledig

Schulbildung:	1980-1988	Polytechnische Oberschule Neustrelitz
	1988-1990	Kinder- und Jugendsportschule Neubrandenburg
	1990-1992	Sportgymnasium Neubrandenburg (Abitur: Juni 1992)
Ausbildung:	08/1992-08/1993	Höhere Berufsfachschule Schwerin: Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Angestellten
	10/1993-09/1997	Studium der Pharmazie an der Humboldt-Universität zu Berlin
	10/1997-04/1998	Pharmaziepraktikum: Pharmazeutische Fabrik Dr. Kade GmbH, Berlin
	05/1998-11/1998	Pharmaziepraktikum: Reuter's Apotheke, Berlin
	Januar 1999	Approbation zur Apothekerin
	seit April 1998	Tätigkeit als wissenschaftliche Assistentin am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin

PUBLIKATIONEN, die aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangen sind:

S. Krase, S. Keipert,

Rheological evaluation of the viscoelastic behaviour of mucin dispersion
(Doktorandentagung 2002, Frankfurt am Main, Posterpräsentation)

S. Krase, S. Keipert,

In vitro permeation study through bovine nasal mucosa. Influence of various formulation parameters on the permeation of cromolyn sodium, xylometazoline HCl and oxymetazoline HCl

(World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2002, Florence, Posterpräsentation)

S. Krase, S. Keipert,

The effect of cromolyn sodium on the viscoelastic behaviour of a mucin dispersion. Influence of different formulation parameters

(„Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“ 2001, Veranstaltung der DPhG Berlin-Brandenburg, Posterpräsentation)

S. Krase, S. Keipert,

Evaluation of in vitro Permeation of disodium cromoglycate through bovine nasal mucosa
(Doktorandentagung 2000, Frankfurt am Main, Posterpräsentation)

S. Krase, S. Keipert,

Commercial preparations of oxymetazoline HCl, xylometazoline HCl and disodium cromoglycate. An in vitro permeation and mucin interaction study

(in Vorbereitung zur Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift)

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin im Februar 2003

Sigrun Krase